Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular.

Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

Tesis Doctoral

Herramientas informáticas aplicadas al desarrollo de productos de uso tópico

Memoria presentada para optar al título de doctor en Biociencias moleculares por

Carolina Pavicic Martínez

Madrid, 2020

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Biología Molecular.

Fundación Parque Científico de Madrid

Empresa Innovative Health Group, S.L.

Herramientas informáticas aplicadas al desarrollo de productos de uso tópico.

Carolina Pavicic Martínez.

Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid.

Directores:

María de los Ángeles Muñoz Fernández

Eduardo Muñoz Blanco

Tutor:

Manuel Fresno Escudero

Agradecimientos

La tesis es una carrera de fondo donde finalizan los estudios de años y a la vez es el comienzo de una etapa donde los objetivos futuros se basan en los cimientos desarrollados. El crecimiento y conocimiento desarrollado me ha proporcionado una actitud, forma de pensar, y resiliencia en la vida, donde el conocimiento adquirido me definirá como persona y profesión, que no hubiera sido posible sin todas las personas que me han ayudado a crecer en el camino, a las cuales deseo me sigan acompañando y ayudando en los próximos pasos.

Primero agradecer a la empresa InnoHealth por la confianza depositada en mí y toda la ayuda durante todos estos años. Al ministerio de Educación por la beca de doctorado industrial que ha permitido el desarrollo. A mis directores de tesis Mª Ángeles Muñoz Fernández y Eduardo Muñoz Blanco por hacer posible este proyecto y ayudarme a desarrollarlo. Por un lado, agradecer especialmente a Eduardo Muñoz Molina por su constancia y perseverancia para que el proyecto salga adelante. Gracias por la confianza depositada en mí, y ayudarme diariamente en el desarrollo de toda la tesis. Por otro lado, especialmente a David Jiménez, porque sin él no hubiera sido posible este desarrollo, gracias por quedarte y ayudarme a crecer tanto profesionalmente como personalmente.

A mis compañeros por la ayuda diaria y por esos días de desayunos que han hecho tan ameno el día a día. Especialmente a Martín, por todas esas horas y altibajos diarios, gracias por todo el apoyo, por esa actitud de constancia y ayuda a los demás, eres un gran ejemplo. Estrella, porque a pesar de la distancia, tu trabajo es la base de esta tesis, gracias por tu ayuda constante. Ana, gracias por esa felicidad que transmites a diario, es un placer trabajar contigo, gracias por ayudarme a la validación y las combinaciones. A los que ya no están en la empresa, ha sido un placer cruzarnos en el camino, gracias por la confianza y por la ayuda diaria para seguir adelante.

A mis amigos, gracias por estos años de caos, por estar siempre ahí, apoyarme. Especialmente a Rubén y Juanjo, es un grandísimo placer pasar cada sábado juntos, sois un gran ejemplo de ayuda y desarrollo personal, gracias por estos últimos 6 años y por incluirme en esos proyectos maravillosos. Clara y María, mis compañeras de carrera, gracias por apoyarme en los peores momentos y estar siempre a pesar de la distancia, por todas las fiestas y días estudiando en la biblioteca. Lucía, gran amiga y compañera, que

suerte cruzarme contigo, gracias por escucharme siempre. Liliana gracias por arreglarme física y emocionalmente, sin ti la recta final no hubiera sido lo mismo. Mónica gracias por descubrirme la grafología y otras mil cosas, me has ayudado a salir de los peores momentos, gracias por la ayuda incondicional. Sara y Omar, por todas esas clases de inglés, gracias por estar siempre y las risas diarias.

A mi familia, especialmente a mis tíos Roberto y Nuria, sin su apoyo en el máster jamás estaría aquí, gracias por un apoyo tan grande en un momento tan necesario. A mi hermana y gran amiga, mi prima Blanca, gracias por estar siempre ahí, por esos viajes, rutas y salidas geniales, gracias por estar en los momentos más difíciles. A mis tíos Miguel Ángel y Marijose, por el apoyo incondicional siempre y constante, por estar pendiente de que todos estemos bien y estar siempre en los momentos más difíciles. Especialmente a mi tío por impulsarme a encontrar este trabajo. Al resto de la familia gracias por todo el apoyo y amor recibido.

Finalmente, a las personas que están siempre a diario. Marco, gracias por sostenerme, por el apoyo constante, por abrirme la puerta cada miércoles, has sido un pilar fundamental en estos últimos años, mi compañero de viajes y de vida, gracias por descubrirme el maravilloso mundo de las plantas. A mis padres, gracias por todo el esfuerzo, todas las semillas plantadas empiezan a dar sus frutos. A mi padre por levantarse cada día a las 5 de la mañana para darme todo lo necesario, papa allá donde estés, mereció la pena. A mi madre, por enseñarme a luchar por lo que deseas, por levantarme cada día, seguir adelante y ser una guerrera, a solventar hasta la peor enfermedad una y otra vez. Sin vosotros nada tendría sentido, gracias por enseñarme unos valores y esa actitud diaria, porque esto tiene mucho más valor que cualquier cosa material, sin vuestro apoyo y vuestro ejemplo no sería quien soy.

A todas las personas que han estado en estos años, gracias por cada momento vivido, apoyo y ayuda.

Resumen

El uso de preparaciones de uso tópico como los cosméticos es una práctica común desde hace siglos y cuya regulación se ha establecido en tiempos modernos. La nomenclatura más importante de los ingredientes cosméticos se estipula por el código INCI, que es una nomenclatura internacional para nombrar a los ingredientes y homogenizar de alguna manera los productos fabricados por diferentes empresas. En 2009 se determinó la regulación para el desarrollo y comercialización de los ingredientes cosméticos y en 2013 se prohibió su uso en animales para demostrar su eficacia. Desde este momento se realizó un cambio radical en este mercado, donde la investigación empezó a cobrar un punto clave en el desarrollo de una cosmética más consciente en su aplicación.

Actualmente, la investigación del mecanismo de acción de los ingredientes cosméticos se centra en experimentos *in vitro*. Así, innoHealth ha desarrollado una plataforma denominada SimDerma, la cual incluye 30 modelos experimentales que ha servido para hacer un estudio de una amplia colección de ingredientes cosméticos y cuyos resultados se han introducido en una importante base de datos. En la actualidad, un gran porcentaje de los cosméticos comercializados se basan en combinaciones de ingredientes que pretenden potenciar la actividad de cada uno de ellos a nivel individual. No obstante, la manera actual de combinar ingredientes se basa en datos subjetivos basados fundamentalmente en fuentes bibliográficas y otro tipo de información. Así, se han desarrollado diferentes herramientas informáticas que aún no han resuelto el problema inherente al desarrollo de combinaciones. Dos de los grandes problemas no resueltos a la hora de combinar son en primer lugar, que ingredientes con el mismo código INCI de diferentes proveedores pueden tener actividades biológicas totalmente diferentes, y en segundo lugar que la combinación de ingredientes pueden dar lugar a efectos antagónicos sobre una determinada diana. En este trabajo se ha desarrollado una nueva plataforma informática denominada INCOS (*INgredient COmbinatorial System*) para desarrollar combinaciones optimizadas de ingredientes cosméticos a partir de la información obtenida en SimDerma y a bases de datos externas. La aplicación de INCOS puede dar respuesta al desarrollo eficaz de formulaciones cosméticas con actividades superiores a las de los ingredientes individuales.

Abstract

The use of topical preparations such as skin products has been a common practice for centuries, although its regulation has been established in modern times. The nomenclatures of cosmetic ingredients have been denominated by the INCI, International Nomenclature Cosmetic Ingredient, used in all the cosmetic world which homogenizes the products manufactured by different companies. In 2009, the ingredient regulation and cosmetic ingredient commercialization was determined, and in 2013 animal tested ingredients to demonstrate effectiveness were prohibited. From this moment on a radical change has been made in this market, where the investigation started to become a key point to develop a conscious cosmetic application.

Currently, the investigation of action mechanism in cosmetic ingredients is focused on experimental *in vitro*. Therefore, innoHealth company develops a SimDerma platform, that includes 30 experimental models which serves to make a study of a wide collection in cosmetic ingredients and whose results are introduced into an important database. Nowadays, a great percentage of cosmetic ingredient commercialization are based on combination ingredients that enhance the activity of each of them individually. However, the current way of ingredient combination is based on subjective data known through bibliography and other information types. Due to this, different computer tools have been developed, the problem inherent to the development of combinations has not been resolved by now. Two of the big unsolved problems when combining ingredients, on the first place, is that two ingredients with the same INCI code from different suppliers, can have totally different biologic activities. On the second place, the ingredient combination can make antagonistic activities in a certain target. In this work, a new digital platform called INCOS (*INgredient COmbinatorial System*) has been created to develop optimized combinations of cosmetic ingredients from the information obtained in SimDerma platform. The INCOS application can respond to the effective development of cosmetic formulations with superior activities to those of individual ingredients.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

AAT	Alternative Animal Testing
ACID	Atómicas, Coherentes, Aisladas y Duraderas
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
API	Application Programming Interface
BD	Base de datos
CAS number	Chemical Abstracts Service number
CBR	Receptores de cannabinoides
CID	Chemical ID
CI	Combination Index
CIR	Cosmetic Ingredient Review
CosIng	Cosmetic Ingredient Database
CMR	Carcinogenic, Mutagenic, Reprotoxic
CPNP	Sistema electrónico de notificación de productos
CSS	Cascading Style Sheets
DB	Database
DBMS	Database Management System
EC number	European Comunity number
ECHA	European Chemicals Agency
HTML	Hiper Text Markup Language
ICCR	International Cooperation on Cosmetics Regulation
IDE	Entorno de desarrollo Integrado
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
InChi	International Chemical Identifier
INCOS	INgredient COmbinatorial System
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JS	Java Script
JSON	JavaScript Object Notation
LIMS	Laboratory Information Management System
LRSS	Long Range Science Strategy

MVC	Modelo, Vista, Controlador
NOAEL	No Observed Adversed Effect Level
NF-κB	Factor nuclear kappa B
PCPC	Personal Care Product Council
PHP	Hypertext Preprocessor
Pmid	Pubmed ID
PPARs	Proliferación de peroxisomas
QSAR	Quantitive Structure-Activity Relationship
RDB	Relational Database
REACH	European Chemicals Agency
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
SBDG	Sistema de Gestión de Bases de datos
SMILE	Simplified Molecular Input Line Entry System
SOP	Standard Operating Procedure
SQL	Structure Query Language
TRPV1	Transient Receptor Vanilloid
UE	Unión Europea
UML	Unified Modeling Language
XML	Extensible Markup Language

Introducción

1. Antecedentes históricos de la cosmética

La búsqueda de la belleza se remonta milenios atrás, desde el primer momento que el hombre vio su reflejo siempre quiso mejorar o hacer cambios en su aspecto, por ello la historia de la cosmética comienza unos 10000 años a.C., siendo un sello de identidad de culturas y desarrollo de cada civilización. En la prehistoria, usaban colores para pintarse el cuerpo con marcas usando arcillas, tierras o extractos de plantas. Los sumerios dejaron tablillas de arcilla donde describieron la elaboración de algunos ungüentos y perfumes. Pero el origen más detallado se conoce en el antiguo Egipto, donde el cuidado personal tuvo una gran relevancia, usando perfumes y plantas para la salud y el bienestar. La importancia de los cosméticos permitía conectar a las personas con los dioses, en el libro de los muertos, se detallan los rituales fúnebres para la preparación de embalsamamiento del cuerpo. Las mujeres usaban khol (polvo de antimonio), para maquillar los ojos, pero también les protegía de las infecciones, ya que es bactericida y fungicida. El papiro de Ebers es el escrito más conocido por detallar los preparados cosméticos de esta época, donde se dedicaba un capítulo al tratamiento del cabello. El pelo, pies y manos eran decorados o teñidos con Henna, extracto de la planta *Lewsonia Inermis*. Cabe mencionar al último faraón Cleopatra VII, conocida por su alto intelecto y su belleza única, además de sus cuidados de la piel siendo un canon de belleza desde entonces. En oriente, y más en concreto en la India, se usaban olores de especias como sándalo o incienso, y usaban un tinte negro llamado Kajul (parecido al khol). En China utilizaban goma arábica con gelatina para pintarse las uñas, y extracto de polvo de arroz para blanquear la piel (Blanco-Dávila 2000; Chaudhri and Jain 2009).

Pero no fue hasta la época griega y romana, donde se adoptó el rito del baño de los egipcios y fue aplicado al uso diario con la utilización de los baños públicos. Dieron el nombre de "cosmetikos", origen de la palabra cosmos, como orden y belleza, siendo así el arte de embellecerse. Además, Platón diferenció dos tipos de cosmética, "ars ornatix" para la limpieza y pureza, para eliminar tóxicos del cuerpo, y "ars fugartrix" para disimular el paso del tiempo. Cabe mencionar a Galeno, médico, cirujano y filósofo que finalizó sus estudios en Alejandría, la cual sería posteriormente la ciudad de la cuna del conocimiento donde se estudiaba desde Medicina hasta el cuidado de la piel (Hernando et al. 2004).

En la edad media el cuidado personal se fue dejando de lado ya que se consideraba asunto de fe, por ello surgen dos corrientes, los creyentes que lo consideran impuro y los que

seguían los estudios científicos en Alejandría. Entre los siglos X al XIII, cabe destacar dos personas importantes son: Avicenna (Ibn Sina) que desarrollo el alambique, y con ello la destilación de aromas, y Maimónides (Moses ben Maimon) escritor del libro "Preservación de la belleza". En el S. XII resurge la cosmética y, por ejemplo, aparece el jabón de Marsella, en la Provenza francesa.

En el S. XV, la conquista de América favorece la llegada de nuevas especies incorporando nuevas fragancias, ungüentos o preparados, ya que los Mayas eran conocidos por sus tatuajes y los Aztecas por sus grandes conocimientos en el uso de plantas medicinales. Posteriormente, en el S. XVII, la cosmética se sitúa en la corte francesa e inglesa, donde en París se instala el primer centro de belleza. Con la revolución francesa surgen dos espacios en la casa, el baño y la ducha, que favorecen el resurgimiento de la limpieza. En el S. XVIII la cosmética es de uso diario, se incluye maquillaje, tatuajes, y barbas de diferentes formas (Blanco-Dávila, 2000) .

En los dos últimos siglos comienza el desarrollo de la industria cosmética, donde se generan las primeras marcas como Guerlain y Bonjours, y se crean las primeras compañías más famosas como L'Oreal y Max factor, además de la revolución en el afeitado con la maquinilla de afeitar Gillette. Coco Chanel provoca un cambio de revolución en el canon de la belleza y la estética. En 1970 se desarrollan la normativa tanto en Estados Unidos como en Europa para la regulación de los cosméticos, y se comienza a instaurar una legislación común para llevar a cabo un seguimiento de los cosméticos, usos y contenido de estos.

Por último, en el S.XX surge un movimiento de cosmética natural o ecológica, con los certificados de garantía de calidad, evitando el uso de compuestos químicos perjudiciales para la salud, y ya en el año 2013 se prohíbe el uso de animales para detectar la toxicidad de los cosméticos. Actualmente, la cosmética es una industria en constante cambio, donde la investigación está cobrando un punto importante en todo el proceso de desarrollo de un cosmético, (Hernando et al. 2004).

2. Estructura de la piel

La piel, del latín *pellis* (cubrir, envolver), es el órgano más extenso del cuerpo humano que mide unos 2 m^2. Forma parte de la inmunidad innata ya que actúa como barrera protectora del organismo protegiendo el cuerpo frente a agentes externos, infecciones y eliminación

de agua. Se divide en tres capas principales, epidermis, dermis e hipodermis o tejido subcutáneo, donde cada una de ellas cumple una función específica.

La epidermis es la capa más superficial de la piel, en contacto con el ambiente, compuesta principalmente de células llamadas queratinocitos. Se divide en 5 subcapas o estratos, donde cada capa es una maduración de los queratinocitos, debido a un proceso de queratinización de la proteína filamentosa llamada queratina, por ello, cuanto más externa esté la célula expresará una mayor cantidad de queratinas y tendrá una estructura más aplanada. La epidermis es una capa dinámica ya que se renueva cada 15-30 días desde la capa más interna a la externa y varía en función de la edad, zona del cuerpo y factores externos (Losquadro 2017). Realizando un recorrido del estrato más interno al externo, nos encontramos con los estratos basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo (Figura 1.2.1).

El estrato basal o estrato germinativo, se compone de una capa de queratinocitos basales, la cual es la encargada de reponer células y mantener la homeostasis del órgano. La piel mantiene su tamaño constante, debido a que la capa basal repone las células que son eliminadas por la última capa con la descamación de la piel. Esta capa es el estrato que divide la epidermis de la dermis y además contiene melanocitos que son responsables de generar melanina, sustancia protectora de la radiación solar (Gonzales and Fuchs 2017; Solanas and Benitah 2013). Las células se conectan entre sí mediante complejos de adhesión intercelular llamados desmosomas, uniones compuestas por complejos de cadherinas que se acoplan a los filamentos intermedios, situados en la matriz extracelular, a través de complejos proteicos (Johnson, Najor, and Green 2014). Estas estructuras son esenciales para el mantenimiento de los epitelios y la homeostasis del tejido (Price et al. 2018), establecen la integración mecánica entre células, los cuales al generar una tensión provocan la división celular de la célula basal y así reponen las células tanto basales como de capas superiores (Alonso and Fuchs 2003).

El estrato espinoso, compuesto de células denominadas queratinocitos espinosos, se denominan así debido a su contenido en el citosol de tonofibrillas en forma de espinas, las cuales se unen a la parte más externa de la célula acabando en desmosomas que son las uniones con las células contiguas. El estrato granuloso está compuesto de queratinocitos granulosos, que se denominan así por contener gránulos de queratohialanina en su interior, sustancia precursora de la queratina. Este estrato se compone de varias capas, donde en cada capa va perdiendo orgánulos hasta la capa final del estrato donde las células mueren,

vertiendo su contenido al exterior. Presenta un alto contenido en lípidos en la membrana intracelular, lo que confiere mayor impermeabilidad a la piel (Baroni et al. 2012; Koster and Roop 2007). En estas dos últimas capas también están presentes las células de Langerhans encargadas de iniciar la respuesta inmune específica en la piel (Abdayem and Haftek 2018; Eckhart et al. 2013; Losquadro 2017).

El estrato lúcido es una capa muy fina donde las células mueren y los gránulos de queratina desaparecen produciendo el proceso de cornificación, es decir, las células se queratinizan. Ocurren tres procesos en esta capa intermedia, se rompen los orgánulos favoreciendo la compactación del citosol, se compactan las proteínas de las células formando la cornificación y se unen las células formando una capa compacta de queratina y lípidos, pero sin función celular. Finalmente, la capa más superficial es el estrato córneo, se compone de queratinocitos córneos o corneocitos, los cuales tienen una forma aplanada y hexagonal, son anucleares y se componen principalmente de queratina. Las células se unen entre sí mediante complejos sistemas de unión y complejos lipídicos. Esta capa es la más grande y la responsable de la descamación de la piel (Eckhart et al. 2013). La forma hexagonal de las células es la forma más eficiente de estructura en un plano, lo que hace que esta capa sea la más importante ya que impide la entrada de agentes externos y además evita la evaporación de agua de la piel (Hannezo, Prost, and Joanny 2014; Heisenberg and Bellaïche 2013).

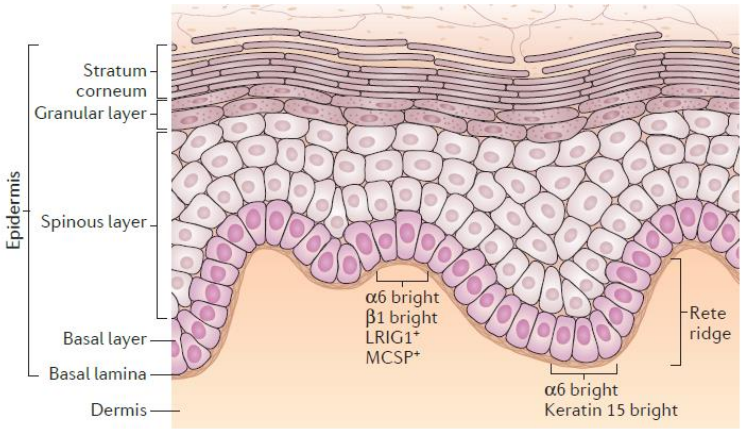


Figura 1.2.1. Estructura de la epidermis (Solanas and Benitah 2013).

La siguiente capa principal de la piel es la dermis, compuesta principalmente de células denominadas fibroblastos, además de macrófagos, mastocitos y reticulocitos, pero su principal componente es su alto contenido en proteínas de la matriz extracelular incluyendo fibras de colágeno y elastina. Se divide a su vez de dos estratos, estrato papilar, más externo

y compuesto principalmente de fibras de colágeno tipo III, y estrato reticular, más interno y mucho más denso, compuesto principalmente por fibras de colágeno tipo I y elastina. Esta capa es la más gruesa de la dermis y contiene folículos pilosos, glándulas sudoríparas y sebáceas, además de músculos piloerectores, vasos sanguíneos y linfáticos (Rippa, Kalabusheva, and Vorotelyak 2019; Tigges et al. 2014).

La capa más interna de la piel es la hipodermis o tejido subcutáneo, situada debajo de la dermis. Está compuesta por fibroblastos y macrófagos, tejido conjuntivo y un gran número de adipocitos que sirven como reserva de grasa, además de vasos sanguíneos que aportan la sangre al resto de las capas más superficiales y vasos linfáticos (Arda, Göksügür, and Tüzün 2014).

El pH de la piel es ácido, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis de la piel. Desde la epidermis a la dermis el pH aumenta en 2-3 unidades, siendo entorno a 4-5 en la capa más superficial y en el interior del cuerpo entorno a 7-9 (Proksch 2018; Rinnerthaler and Richter 2018; Wohlrab, Gebert, and Neubert 2018). Esta característica ayuda al mantenimiento de las diferentes capas y actúa como barrera impidiendo la entrada de agentes externos (Ali and Yosipovitch 2013). Por otro lado, la piel cuenta con multitud de microorganismos que forman una microbiota, actuando de manera sinérgica y favoreciendo una correcta homeostasis del sistema inmunológico (Grice and Segre 2011). Como se ha comentado anteriormente el estrato córneo es la capa que interactúa con el entorno y se compone de queratina y una composición lipídica que favorece la unión celular generando un bloque que impide la pérdida de agua y la entrada de agentes externos. La composición lipídica y el uso de agentes limpiadores es un punto a tener en cuenta para el mantenimiento de la permeabilidad de la piel (Jia et al. 2018). Por ello, las sustancias aplicadas a la piel deben respetar el pH, microbiota y composición lipídica, para poder mantener su homeostasis y por lo tanto evitar diferentes patologías asociadas a la descompensación de estos factores importantes.

3. Productos cosméticos.

3.1. Definición

Según el Diccionario de la Real Academia de la Lengua, un cosmético es: "Dícese de los productos que se utilizan para la higiene o belleza del cuerpo, especialmente el rostro". Pero para tener una definición más clara tenemos que referirnos a la legislación vigente de producto sanitario. En el real decreto realizado por la Agencia Española del medicamentos y productos sanitarios (AEMPS) queda especificado que un producto cosmético sanitario es: "*Toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir olores corporales.".* Además, se especifica que: "*Quedan excluidos del presente Real Decreto aquellos preparados destinados a la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como los destinados a ser ingeridos, inhalados, inyectados o implantados en el cuerpo humano. Tampoco se consideran cosméticos aquellos preparados destinados a la protección frente a la contaminación o infección por microorganismos, hongos o parásitos*". Por otro lado, un medicamento viene definido como: "*Toda sustancia y sus asociaciones o combinaciones destinadas a su utilización en las personas o en los animales que se presenten dotadas de propiedades para prevenir, diagnosticar, tratar, aliviar o curar enfermedades o dolencias o para afectar a funciones corporales o al estado mental*".

Teniendo en cuenta ambas definiciones, se diferencian dos puntos claros entre un medicamento y un cosmético. Por un lado, un medicamento es utilizado para prevenir, tratar, curar, y un cosmético es utilizado para mantener el estado de la piel. Por otro lado, un cosmético solo se aplica externamente y un medicamento se puede administrar de diversas maneras. Por ello, un cosmético requiere de inocuidad y eficacia sin presentar un efecto terapéutico ya que se consideraría un fármaco. Su eficacia se mide en función de su finalidad, teniendo en cuenta desde métodos objetivos a subjetivos, para ello, el deseo del consumidor que valorará diferentes puntos como son brillo, textura, olor, color, densidad, etc.

Las personas identifican los productos cosméticos a cremas o perfumes, pero también lo son los champús, jabones, maquillaje, desodorante, etc. En todos los productos existen

diferentes tipos de componentes presentes en un cosmético que son: principios activos, excipientes, aditivos y correctores. Estos principios activos son los responsables de la actividad del cosmético y por tanto va asociado a la función o finalidad de este.

El excipiente es la sustancia o grupo de sustancias que actúan como soporte o base para el resto de los componentes, disueltos o en suspensión. Es la sustancia mayoritaria y debe ser capaz de disolver o contener al resto de sustancias de manera proporcional y distribuida correctamente. Los excipientes son responsables de la forma del cosmético, ya que puede verse como líquido, crema, emulsión, etc… Debe incluirse de forma que facilite el uso del principio activo y su aplicación. El excipiente más común es el agua, ya que es el disolvente universal, inocuo, facilita su uso, es barato, fácil de obtener y no produce efectos adversos. El principal problema es que la piel se encuentra recubierta por capa de lípidos, no solubles en agua, por ello, los cosméticos suelen estar emulsionados en una proporción agua aceite que permite y facilita la fusión con la piel y la inserción de los principios activos. Para estabilizar las emulsiones se añaden tensioactivos, que formarán parte de los excipientes en la mayoría de los casos. Así se establecen dos tipos de emulsiones, las que tienen aceite o agua como componente mayoritario.

Los aditivos y correctores son sustancias que mejoran la calidad del producto, facilitan su aplicación, mejoran el olor, color, y lo protegen de agentes biológicos o químicos. Muchos son estabilizantes, emulsionantes, antioxidantes, antimicrobianos, espesantes, controladores de pH, humectantes, conservantes, etc.

3.2. Regulación y legislación

En 1976 comenzó la regulación europea donde se organizó una comisión para la regulación de productos cosméticos en Europa. En 1979 se estableció el comité científico de seguridad de los consumidores en cosmética (SCCS). En 1980 se publicó una lista de los conservantes que se podían utilizar. En 1990 se difundió la lista de filtros UV que se pueden usar. En 1993 se implantaron las reglas para el desarrollo de los productos, donde se establece que cada producto debe tener una ficha de seguridad para poder ser revisada por las autoridades de control y correcto etiquetado del producto. En 2000 se aprobó el primer método alternativo de testado en animales, con testado realizado *in vitro*. En 2001 se creó el organismo que legisla los compuestos químicos, REACH (*European Chemicals Agency*). En 2003 el comité directivo estableció el fin del uso de animales para desarrollo cosmético

y categorizó los ingredientes según las siglas CMR (Carcinogénico, Mutagénico y Reprotóxico). En 2009 se estableció la nueva legislación de cosméticos, donde se iguala en todos los estados miembros de la UE, y además se instauró un sistema electrónico de notificación de productos (CPNP) que ayuda a unificar los anteriores (Eixarch, Wyness, and Sibanda 2019). Por último, en 2013 entró en vigor la prohibición de pruebas de testado en animales, no pudiéndose realizar ningún tipo de pruebas, ni la comercialización de ingredientes ya testados.

Los productos cosméticos son utilizados para el cuidado diario, por ello la legislación en España está regida por el reglamento cosmético europeo. Esta legislación garantiza su seguridad, eficacia y calidad de los ingredientes, su composición, proceso de fabricación y envase. Cada cosmético pasa un examen de seguridad, el cual es realizado y revisado, por la comisión europea a través del comité científico SCCS de los consumidores de la unión europea.

Para garantizar la seguridad y calidad del producto, se debe tener en cuenta la correcta formulación, presentación, envasado, etiquetado, almacenamiento y distribución óptimas. Aunque la responsabilidad de la seguridad del producto debe venir garantizada por el fabricante de cada producto, para ello, cada cosmético debe tener detallado la composición y los ensayos realizados en la ficha del producto.

Para que un producto circule libremente debe estar legislado y regulado cumpliendo las normas de etiquetado, embalaje y seguridad. La legislación europea exige que en el envase del producto final figure la lista de ingredientes según la nomenclatura INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients* – Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos), descritos de mayor a menor concentración y los extractos botánicos van con su nomenclatura botánica. Por otro lado, debe aparecer el número del lote, fecha de duración mínima, función del cosmético, precauciones de empleo, persona responsable. Con esta información el usuario está informado de la calidad, composición y utilización del producto. El empaquetamiento y producción del producto debe estar exento de agentes bacterianos, en salas aisladas con higiene que garantice la calidad del producto.

Toda la información de ingredientes y su regulación viene estipulada en CosIng (*Cosmetic Ingredient Database*), herramienta on-line donde se puede obtener la información de los ingredientes, sus usos y sus restricciones, así como su número CAS (*Chemical Abstract Service*), número EC (*European Comunity*) o nomenclatura INCI. Además, establece una

serie de anexos donde se determinan las sustancias prohibidas (Anexo II), o sustancias restrictivas, donde se limita la concentración o la proporción en la que debe aparecer en el producto final, la zona de aplicación o las condiciones de uso (Anexo III), colorantes (Anexo IV), conservantes (Anexo V) y filtros UV (Anexo VI). Esta herramienta permite la información y correcto uso de la nomenclatura, estableciendo unas normas comunes y reglas, facilitando así su implementación. El reglamento requiere evaluaciones de seguridad que exijan al producto información química y el nivel de exposición del producto. Se hace hincapié en a la zona donde se va a aplicar, donde los productos para niños e higiene íntima son sometidos a un protocolo específico (AEMPS).

3.3. Mercado de la cosmética

El mercado cosmético de cuidado de la piel se considera uno de los más importantes a nivel mundial ya que está valorado en 78,6 billones de euros anuales (datos de 2018). En Europa, Alemania es el país con mayor mercado, en 13,8 billones de euros, seguido de Francia con 11,4 billones de euros. La industria del cuidado de la piel aporta 29 billones de euros a nivel europeo, donde 11 billones son de producción de productos y 18 billones son dedicados a los procesos intermedios. Además, induce a la actividad económica aportando 2 millones de puestos de trabajo, donde 200.000 son puestos directos y el resto son indirectos.

La cosmética es una industria en continua renovación y crecimiento exponencial que realiza un esfuerzo continuo para el desarrollo de producto e inversión en actividad I+D mejorando la competitividad europea y contribuyendo a la mejora del mercado. Esto se ve reflejado en las grandes empresas, las cuales dedican un 5% de su facturación anual al desarrollo de I+D, suponiendo que todas las empresas lo realicen, la inversión en I+D fue en 2017 de 2.35 mil millones de euros. Por ello, la asociación de empresas a centros de investigación o la creación de empresas para investigación dermocosmética está actualmente en auge. Así, unos 29.000 científicos trabajan para la industria cosmética, en un amplio rango de disciplinas, desde biología, química, bioquímica, física, toxicología, reología, nanociencia, fisiología, química analítica, etc. Esto promueve una industria de mano cualificada para el desarrollo de nuevas perspectivas en el mercado.

Uno de los puntos más importantes para la industria es el desarrollo de técnicas alternativas para reemplazar el testado en animales. Por ello, la inversión en alternativas como técnicas *in vitro* que ayuden a disminuir esta técnica es uno de los puntos más relevantes en el

desarrollo actual. Por lo cual, en Europa se ha invertido millones en los últimos 20 años para el desarrollo en investigación de técnicas que avalen y controlen la toxicidad y la actividad de los cosméticos de manera segura y eficaz, disminuyendo así el alto coste y tiempo, evitando el uso de animales. Esto último, es la parte más controvertida en la industria de la cosmética y, por lo tanto, en la que más se invierte y desarrolla actualmente. Una de las mayores iniciativas es LRSS (*Long Range Science Strategy*) que ha desarrollado el programa AAT (*Alternative Animal Testing*), el cual se centra en 5 puntos muy relevantes: irritación de los ojos, genotoxicidad y mutagénesis, sensibilidad en la piel, metabolismo y biodisponibilidad en la piel, y sistemas de toxicidad. Con ello, se han desarrollado varios grupos de trabajo que conectan con diferentes áreas, que permiten obtener un desarrollo de técnicas alternativas fiables para evitar el testado en animales (https://cosmeticseurope.eu/cosmetics-industry/).

3.4. Investigación en Cosmética

Como se ha comentado anteriormente la investigación básica y aplicada en cosmética con unos estándares científicos de calidad comenzó en el año 1976 con la implantación de una reglamentación europea para el desarrollo de cosméticos. Posteriormente en el año 2013 se prohibió la comercialización de ingredientes que habían sido testados en animales. La UE fue pionera en este punto, de tal forma que actualmente solo China permite el testado de animales de productos cosméticos. Este punto de inflexión hizo que la investigación en diferentes métodos alternativos al uso de animales cobrará un enorme auge buscando métodos para investigar la toxicidad, efectividad y uso seguro de los cosméticos. Por otro lado, desde el año 2000 se ha desarrollado una tendencia a la cosmética natural, donde se utilicen menos productos químicos y más extractos de plantas, ello ha contribuido a la investigación de estos ingredientes, especialmente usando combinaciones de estos.

Existen diferentes áreas científicas que abarcan la cosmética desde diferentes puntos. La cosmetología, estudia la acción y los efectos cosméticos en el ser humano, usando bases científicas como son la fisiología, bioquímica, farmacología, microbiología o dermatología. La galénica estudia el preparado del cosmético, donde los ingredientes activos estén presentes. La química cosmética evalúa las materias primas y las interacciones en el producto cosmético, así como sus propiedades químicas y fisicoquímicas.

Aunque en teoría los cosméticos deben ser dirigidos solo a la epidermis, en realidad la investigación en cosmética actualmente se realiza en cada capa de la piel, en la relación dosis-efecto y así se observa su nivel de actuación, además del nivel de penetración y la toxicología de cada ingrediente. Desde este punto de vista, se realiza un estudio *in vitro* a nivel celular de cada tipo de célula que compone a la piel, donde se puede observar la información que nos aporta el uso óptimo y la aplicación de cada ingrediente, además de poder realizarlo de manera individual y en combinación.

El estudio de los ingredientes, tanto activos como excipientes, darían la información necesaria para conocer el buen uso de los cosméticos y para poder realizar una cosmética más focalizada a una aplicación específica o a un tipo de piel especial. Para ello, es necesario empezar con estudios celulares *in vitro*, ya que permiten obtener una información aún más exhaustiva y un conocimiento más avanzado de cada tipo celular presente en la piel. Por otro lado, el estudio con reconstrucciones de la piel a partir de-células (modelos 3D) o explantes de piel, permitirán saber el nivel o grado de penetración y de actividad observada en tres dimensiones (Netzlaff et al. 2005).

Los ensayos *in vitro*, para la seguridad de los ingredientes, son los estudios de toxicología, donde el valor de NOAEL (No Observed Adversed Effect Level) es la dosis más alta que no produce efecto toxico y proporciona el margen de seguridad de un ingrediente. En estos ensayos se mide la genotoxicidad, mutagenicidad, el grado de sensibilidad, absorción, fototoxicidad, etc. El Laboratorio Europeo de Referencia para las Alternativas a la Experimentación con Animales (EURL-ECVAM) y la entidad de Cooperación Internacional sobre regulación en Cosméticos (ICCR) establecieron una serie de métodos alternativos que validaban los estudios *in vitro* como alternativa a estudios con animales. Cada producto o ingrediente químico es evaluado por la ECHA (*European Chemicals Agency*), la cual establece los protocolos de seguridad de cada compuesto y su evaluación para obtener el grado de seguridad de los mismos (de Lapuente et al. 2014).

4. Combinación de ingredientes o ingredientes individuales

Un cosmético debe cumplir tres funciones: higiénica, eutrófica y estética. La función higiénica es aquella que mantiene la piel en condiciones óptimas, asegurando la fisiología de la piel. La función eutrófica es la función que determina la capacidad de un cosmético de conservar el estado de la piel, ya que no debe dañarla si no que además debe mantener

sus condiciones naturales. La función estética es aquella que favorece las funciones sensoriales de vista y olfato de la persona que usa el cosmético. Existen varios factores que pueden afectar a estas ecuaciones: 1) Sinergia, capacidad de acción de dos o más ingredientes al tener un efecto mayor o menor a la acción de cada uno por individual; 2) Incompatibilidad física, cambios en propiedades o estado físico de un producto final; 3) Incompatibilidad química, reacción entre ingredientes dando un efecto diferente al valorado inicialmente; 4) Incompatibilidad biológica, acción de ciertas sustancias contraindicada con un ingrediente, y 5) Acción acumulativa, uso continuado de un producto que puede resultar en actividades positivas o negativas a la aplicación inicial.

Actualmente la composición de los cosméticos es uno de los puntos que más interesa a los consumidores, donde el menor uso de compuestos químicos y el mayor de compuestos naturales son los puntos más importantes para tener en cuenta. El uso de ingredientes individuales es lo más habitual, ya que el conocimiento de cada uno es más fácil desde el punto de vista tanto científico como bibliográfico, su relación dosis-efecto, estructura química o análisis bioquímico. Pero la combinación de ingredientes es una información más rica, debido a que al unir dos o más ingredientes podemos obtener información de antagonismos, sinergias o adiciones. Por ello, existe una tendencia a la observación de la combinación de ingredientes y su eficacia conjunta.

Así, la combinación de ingredientes es uno de los puntos más focalizados en los últimos tiempos, debido a que una buena combinación de ingredientes mejora el efecto biológico considerablemente, pero un mal uso puede tener efectos adversos y contra indicaciones. Por ello, desde hace unos años atrás se han desarrollado diferentes métodos para su valoración. Una combinación de dos o más compuestos puede ser sinérgica, antagónica o aditiva. La sinergia es cuando la combinación presenta mayor actividad que la suma de las actividades individuales. El antagonismo es la actividad de la combinación es menor que la suma de las actividades por individual. El efecto aditivo es cuando la actividad en combinación es la misma que la suma de las actividades individuales. Conociendo estos conceptos, podemos deducir que observar sinergia implica un incremento de la eficacia y una reducción de la dosis manteniendo la eficacia.

Desde el siglo pasado se han planteado diferentes teorías a partir de diferentes puntos de vista para determinar la sinergia de varios compuestos, desde un punto de vista farmacológico, bioquímico o matemático, entre otros. Las más conocidas son los modelos

matemáticos de *"Loewe Additivity"* y *"Bliss Independence"*, y posteriormente el teorema de Chou-Talalay.

El modelo *"Bliss Independence"* se basa en el concepto de que dos compuestos nunca interaccionan entre ellos. Es decir, dos compuestos no actúan sobre la misma diana. Es un método simple para dos compuestos, pero para más compuestos empieza a ser complicado. Este modelo puede generar confusión o dar una respuesta equivoca, ya que dos componentes no tienen por qué actuar de manera independiente, las interacciones entre ellos existen si no la sinergia calculada originaría un error (Foucquier and Guedj 2015)(BLISS 1939).

El modelo "*Loewe Additivity"* es totalmente opuesto al anterior. El concepto se basa en que todos con compuestos añadidos actúan conjuntamente en una diana o en diferentes pero muy parecidas, de tal manera que sea imperceptible la diferencia en su mecanismo de acción. Es un sistema más complejo y más aproximado a la realidad (LOEWE 1953). Ambos modelos son muy extremos pero coinciden en que la curva dosis-respuesta es sigmoidal y creciente (Goldoni and Johansson 2007).

El modelo matemático que describe la unión ligando proteína fue descrito por la ecuación de Hill, nos permite representar gráficamente la actividad de un compuesto (Hill 1910). Posteriormente se describió mediante la ecuación del efecto medio y la ley de acción de masas, donde ambas se basan en la ecuación de Hill. Estas reglas matemáticas son las ecuaciones en las que se basa el método de Chou-Talalay (Ting-Chao Chou 2006).

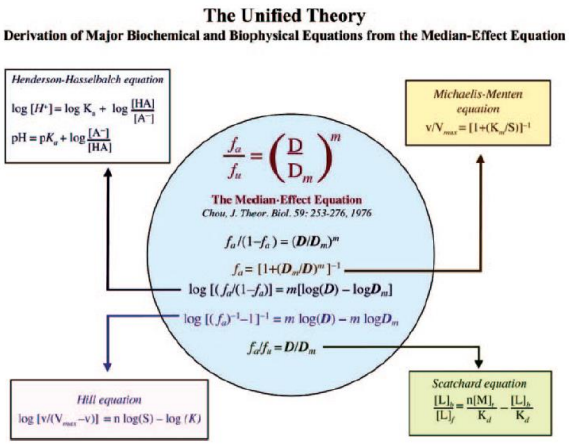


Figura 1.4.1. Método de Chou-Talalay.

El método se desarrolla mediante la unificación de las ecuaciones donde se obtiene el índice de combinación, el cual introduce los términos de sinergia y antagonismo. Si CI

(*Combination Index*) es mayor que 1 los compuestos son sinérgicos, y si es menor son antagónicos.

Finalmente, se han propuesto métodos estadísticos que predicen la probabilidad de observar la sinergia, para ello se han desarrollado redes bayesianas aplicadas de diferentes puntos. Los métodos estadísticos se basan en predicciones, por ello tener una buena base de conocimiento y datos para validar el procedimiento es fundamental en estos métodos. Estos métodos son más recientes y menos conocidos, pero con la cantidad de datos de combinaciones y los posibles a generar puede ser un punto de inflexión en el desarrollo actual de cosméticos (Roell, Reif, and Motsinger-Reif 2017).

5. Herramientas actuales en informática

La tendencia actual en cosmética es la combinación de ingredientes donde el estudio de la actividad de estas combinaciones es fundamental. Así, se han desarrollado herramientas informáticas para el correcto uso de los ingredientes cosméticos y que incluyen datos de reglamentación, aplicaciones, y combinaciones correctas.

Coptis, es una empresa que comercializa tres herramientas, "*laboratory"*, "*ingredients"* y "*tox"*. *"Laboratory"* es una herramienta informática dedicada al desarrollo de fórmulas cosméticas, donde a partir de una formulación base van realizando modificaciones de composición, dosis, u otras, y realizan pruebas posteriores, las cuales generan información que permite seguir mejorando cada fórmula. *"Ingredients"* es una base de datos con los ingredientes y la información de cada uno de ellos, reglamentación, restricciones y vendedores. *"Tox"* es una base de datos con toda la información de toxicidad de cada sustancia, incluyendo la información de NOAEL, LD50 o absorción dérmica (http://www.coptis.com).

COSMOS, es una herramienta con datos de toxicidad de los ingredientes, datos de estructuras y composición química, absorción dérmica y metabolismo. Es una herramienta que comienza con las bases de datos CosIng y PCPC (*Personal Care Product Council*), las cuales complementan con datos de toxicidad y datos de estructuras químicas. Por otro lado, se realizan predicciones de toxicidad con una relación estructura respuesta (QSAR) *in silico* a partir de los datos de toxicidad en función de estructuras químicas.

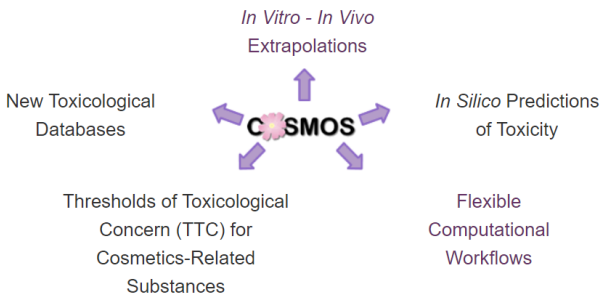


Figura 1.5.1. Proyectos realizados en COSMOS (http://www.cosmostox.eu/home/welcome/).

Lhasa limited (https://www.lhasalimited.org/products/) es una empresa que desarrolla diferentes herramientas informáticas aplicadas a la búsqueda de bases de datos o predicción de diferentes aspectos dentro de la cosmética. Los proyectos que realiza son: predicción de toxicidad (Derek Nexus), predicción estadística de mutagenicidad (Sarah Nexus), predicción de degradación de los compuestos orgánicos (Zenteh), base de datos de compuestos químicos (Vitic), estudio para la búsqueda de impurezas mutagénicas (Mirabilis), búsqueda y generación de una base de datos de toxicidad (Setaria) y predicción del metabolismo de los ingredientes (Meteor Nexus).

LimTox una herramienta web que aplica busca información a partir de textos (TextMining) de toxicidad de compuestos y genes para añadirla a una base de datos (Cañada et al. 2017).

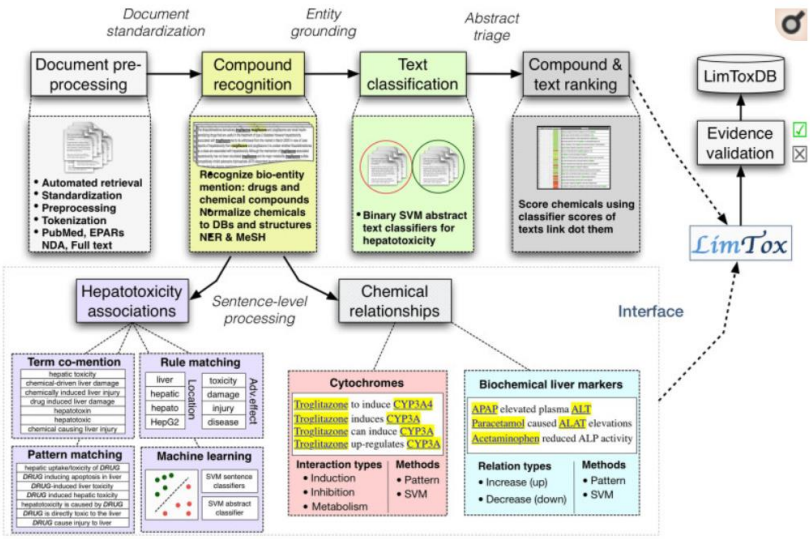


Figura 1.5.2. Esquema de LimTox.

CImbinator es una web, la cual se ha desarrollado para analizar o buscar sinergias entre grupos de datos a pequeña y gran escala. Se desarrolla aplicando la ecuación del efecto

medio, además de ecuaciones matemáticas experimentales describiendo la relación efecto dosis (Flobak et al. 2017).

Compusyn, es un software de uso libre (open source) para la búsqueda de sinergia en una combinación, para ello se necesita la información de cada compuesto por separado y de la combinación de los ingredientes. Se basa en el método de Chou-Talalay anteriormente descrito (http://www.combosyn.com, (T.-C. Chou 2010).

Sin embargo, una limitación importante de todos estos sistemas es que se basan en datos generados por otros, mientras que esto no es especialmente importante cuando se trata de productos químicamente puros (ej. mentol) si es un gran problema cuando se trata de extractos vegetales para uso en cosmética. Por ejemplo, un extracto producido a partir de una planta seguramente será completamente diferente en su composición química y actividad biológica para cada proveedor del extracto. Esto es debido al origen de la planta (cultivada en diferentes condiciones), al método de extracción y la manipulación para tener el producto final. Es decir, y a modo de ejemplo un extracto de centella asiática tendrá una composición química y una actividad biológica diferente en cada proveedor, aunque todos vendan el material con el mismo nombre. Para evitar esta importante limitación la empresa InnoHealth Group (antiguamente SimCosmetic, actualmente parte de Evonik) ha desarrollado SimDerma, una plataforma de ensayos biológicos con dianas de especial relevancia en el campo de la cosmética y también para determinadas patologías de la piel.

6. Dianas celulares relacionadas con SimDerma, relación en cosmética.

En la plataforma SimDerma se determinan entre 30-35 dianas celulares asociadas a diferentes indicaciones cosméticas incluyendo blanqueamiento, antienvejecimiento, piel sensible, antiarrugas, perdida de cabello, luminosidad, e inflamación entre otras. En la siguiente tabla 1.6.1 se puede observar la lista de modelos experimentales presentes en la plataforma y la relación entre los modelos experimentales y las indicaciones aplicadas.

Tabla 1.6.1. Conexión Modelos experimentales indicaciones.

	Anti-Aging	Anti-Wrinkle	Anti-Cellulitis	Whitening	Moisturizer	Refirming	Hair Growth	SunCare	Sensitive Skin	Skin Repair
1. Cytotox. fibdbl asts/k eratinocytes*										
2. Proliferation in fibdbl asts	✔	✔								✔
3. Proliferation in keratinocytes	✔				✔					✔
4. MMP-9 in HaCaT	✔	✔				✔				✔
5. Real-time Wound Healing (fibdbl ast)		✔								✔
6. Real-time Wound Healing (keratinocy.)	✔				✔					✔
7. NF-κB signalling fibdb ./ keratinocytes	✔		✔		✔			✔	✔	
8. IL.6 in fibdbl asts							✔	✔	✔	
9. STAT3 activity							✔			
10. PPARγ activity		✔				✔				
11. PPARα activity	✔				✔					
12. Nrf2 activity	✔				✔			✔		✔
13. Total antioxidant activity	✔			✔	✔			✔		
14. Cellular antioxidant activity			✔	✔	✔					✔
15. PGE_2 in fibdbl asts				✔			✔	✔	✔	
16. Glucose uptake in keratinocytes	✔			✔	✔					
17. CB1 antagonistic activity							✔		✔	
18. CB2 agonistic activity	✔		✔							
19. TRPV-1 agonistic activity		✔				✔				
20. TRPV-1 antagonistic activity		✔						✔	✔	
21. Tyrosinase activity in melanocytes				✔				✔	✔	
22. Melanin synthesis in melanocytes				✔						
23. MMP-1 in HaCaT	✔	✔				✔				✔
24. Autophagy in keratinocytes	✔			✔						
25. HIF-1α in keratinocytes			✔		✔	✔				
26. HIF-1α in fibdbl asts			✔			✔				
27. COL1A2 gene induction (fibdbl asts)		✔				✔				✔
28. Fillagrin gene induction (keratinocy.)					✔			✔		
29. cAMP	✔	✔	✔		✔	✔	✔			✔
30.TIMP-1 in HaCaT	✔	✔				✔				✔

7. Librería de ingredientes

Un producto cosmético se compone de dos fases, una acuosa y otra de aceite, la proporción y las fases se determinan en función del tipo de piel, indicación y aplicación. Estas dos fases se mezclan en una emulsión donde se incluye un emulgente que estabiliza la unión y los compuestos, finalmente se incluyen reguladores de pH, preservantes o aditivos. La base de datos de SimDerma se compone actualmente de unos 600 ingredientes testados obtenidos de unos 40 proveedores. De todos los ingredientes, 390 son extractos de plantas, y los 210 restantes son ingredientes químicos. Los extractos de plantas se diferencian en

dos tipos, acuosos, también llamados hidrolatos o hidrosolubles, o aceites, donde se dispone de unos principios activos totalmente diferentes, liposolubles. Los principios químicos se componen de moléculas de aceites esenciales, reguladores de pH, aditivos, emulgentes, principios activos puros y combinación de compuestos químicos puros. Este punto es fundamental para realizar una clasificación, focalizado en diferenciar su uso y aplicación en el producto final.

Los extractos de plantas son muy variados y por ello hay extractos muy diversos, empezando por los vegetales de uso común como son la zanahoria, pimiento, tomate, fresa, frambuesa, manzana, uva, kiwi, arándano, granada, limón o naranja. Estos extractos suelen ser acuosos y tienen propiedades antioxidantes, donde cabe destacar los cítricos que presentan un pH ácido (Ben Hsouna et al. 2017) Por otro lado, se dispone de extractos solidos o en polvo, como son trigo, avena, arroz, maca o quinoa. Los aceites más usados en cosmética son jojoba, argán, oliva y aguacate. Las algas son un ingrediente muy apreciado y desarrollado en los últimos tiempos, como el *Fucus versiculus* aplicado en cremas focalizadas en celulitis junto con la cafeína (Al-Bader T1, Byrne A, Gillbro J, Mitarotonda A, Metois A, Vial F, Rawlings AV 2012; A Herman and Herman 2013). *Chrorella vulgaris*, es un alga con un alto contenido en clorofila. Por otro lado, se destacan varios extractos conocidos por usarse en síntomas inflamatorios de la piel, como el extracto de *Curcuma Longa*, *Harpagophytum procumbens* o *Arnica montana* (Kim and Park 2015; Park et al. 2012; Schopohl, Grüneberg, and Melzig 2016; da Silva Prade et al. 2020). Un árbol muy conocido en las islas canarias es el árbol de sangre de dragón, *crotón lechleri*, con un amplio historial de uso en cosmética (Gupta, Bleakley, and Gupta 2008). También se dispone de diferentes extractos de resinas de árboles como el incienso. Los aceites esenciales de plantas con una alta concentración de principios activos (geranio, benjuí, pachuli, incienso, romero o tomillo) se utilizan para el olor corporal.

Los compuestos químicos que aportan olor en los aceites esenciales (mentol, linalol, eucalyptol) son conocidos por ser más penetrantes que otros activos, ya que presentan un bajo peso molecular, y también son controvertidos por ser los responsables de diferentes alergias en la piel (Anna Herman and Herman 2015). Por otro lado, dentro de los ingredientes químicos se dispone de principios activos presentes en los extractos de las plantas, como el asiaticoside o madecosside presente en la *centella asiática* (Bylka et al. 2014; Li et al. 2009; Song et al. 2018). Los ácidos ursólico y oleanólico presentes en multitud de extractos (Kashyap et al. 2016; Lim et al. 2007). Los principios activos del

extracto de cannabis, cannabidiol y cannabigerol (García et al. 2018; del Rio et al. 2018). Steviosida es el principio activo más conocido de la *Stevia revaudiana* (Fengyang et al. 2012). Finalmente, se dispone de compuestos químicos incluidos frecuentemente en productos finales y que incluyen diferentes vitaminas por su actividad antioxidante y otros ingredientes como el ácido láctico o ácido cítrico que son usados para equilibrar el pH del producto final (Tang and Yang 2018).

Finalmente, los proveedores de ingredientes son variados y cada uno se focaliza en unos ingredientes concretos. Actualmente, nuestra librería de ingredientes se ha obtenido de alrededor de 40 proveedores (Tabla 1.7.1).

Tabla 1.7.1. Lista de proveedores.

Berkem	Oat cosmetics	ProTec
Biolandes	Provital	Naturex
Biophil iberia	Rahn	Natural Sourcing
Cobiosa	Res pharma	DSM
Corbion	Sigma-aldrich	Bedoukian
Cosphatec	Sinerga	Mibelle biochemistry group
Endoca	Symrise	Merk
Evonik	ChromaDex	GSK
Finzelberg	Sabinsa Corporation	Inquiaroma
Gattefosse	Enzo life Sciences	Massó
GFN	Ibr	Natura-tec
Giovanni	In vitro plant-tech	Indena

8. LIMS (Laboratory Information Management System).

LIMS es una herramienta informática que ayuda a la gestión y organización en el almacenamiento e introducción de datos de laboratorio, donde se introduce cada paso que se realiza en un laboratorio, de tal manera que se puede hacer un seguimiento de cada paso realizado. Esta herramienta necesaria para una correcta gestión y organización de un laboratorio, pero debe ser focalizado a cada laboratorio y sus necesidades (Chen et al. 2016; Maier et al. 2015).

En un laboratorio se realizan multitud de procesos, desde el pedido de los productos hasta la entrada de muestras o mantenimiento de los instrumentos, donde en muchos puntos se dedica más tiempo a estos procesos que al análisis de muestras y obtención de resultados.

Por ello, un sistema de información del laboratorio en la empresa Innohealth es de gran utilidad, mejorando el rendimiento y favoreciendo cada proceso implicado. Por otro lado, las herramientas informáticas ayudan a evitar los errores producidos por las personas implicadas en los procesos.

Un sistema informático es diseñado para cada laboratorio y cada proceso implicado. Por ello se inicia con un sistema de base de datos personalizado, donde cada dato se incluya correctamente, no se repita, no presente limitaciones de capacidad de almacenamiento y no presente pérdida de datos. Una vez incluidos los datos se aplica a cada uno de ellos un sistema de cálculo automático de las reglas matemáticas descritas anteriormente y la aplicación de herramientas visuales como son diferentes gráficos. Además de la capacidad de exportar todos los datos en cada punto del proceso, se realizan sus análisis e informes tanto iniciales como finales. Estos puntos son claves para mejorar el proceso, agilizar los pasos en el laboratorio, mejorando el proceso de análisis de datos y evitando la producción de errores comunes en el proceso. Por ello, un sistema LIMS es una herramienta adaptada a cada laboratorio, sus procesos y personas implicadas, se desarrolla como una aplicación web donde no existan problemas de descargas adaptación a su uso y donde el seguimiento se pueda realizar de manera diaria y constante.

Por lo tanto, las características para las cuales se utiliza este sistema es para la gestión de datos, su control y especificación, asignación de códigos, toma de muestras, cálculo de valores automáticos, obtención de informes de resultados y de trazabilidad de cada proceso, introducción de lotes de muestras, fechas y análisis en la calibración de aparatos, obtención de resultados de aparatos automáticamente, conexión según usuario, generación de avisos o incidencias, trazabilidad de cada proceso, etc.

Finalmente, esta herramienta es fundamental para la aplicación de normas de seguridad en el laboratorio, donde las normas de calidad exigen una trazabilidad de cada proceso implicado. Además de obtener una información de cada persona implicada en el proceso, cada instrumento y su análisis en cada paso.

Objetivos

El desarrollo de cosméticos para indicaciones específicas requiere de un estudio detallado de los ingredientes óptimos y su correcta combinación. Para ello, cada ingrediente aplicado a uso tópico es estudiado detallando su efecto y acción sobre la piel, pero esta información se encuentra disipada en múltiples bases de datos y formatos, por lo que, se encuentra una gran dificultad a la hora de cotejar la información, organizarla y definirla para poder desarrollar nuevas combinaciones de ingredientes con una eficacia demostrada.

Actualmente, el uso de herramientas informáticas en este campo es de gran utilidad estando en auge, favoreciendo el desarrollo de herramientas que permitan la unificación de bases de datos y permitiendo adquirir, tratar, integrar, almacenar y combinar la información obtenida para un único objetivo, el uso correcto de combinaciones de ingredientes en el ámbito cosmético. No obstante, las herramientas informáticas actuales tienen grandes limitaciones y por ello el objetivo principal de esta tesis es desarrollar un sistema denominado INCOS (*INgredients COmbinatorial System*) que puede dar una respuesta para desarrollar nuevos productos cosméticos más eficaces basados en la combinación de ingredientes activos previamente seleccionados e investigados *in vitro* contra un panel de dianas cosméticas. Los principales objetivos de esta Tesis son los siguientes:

1. Diseñar y desarrollar un sistema de base de datos relacional.
2. Introducir datos procedentes de bases de datos, tanto públicas como internas obtenidas, de la plataforma SimDerma.
3. Diseñar y desarrollar LIMS, sistema de manejo de datos del laboratorio obtenidos de la plataforma SimDerma.
4. Introducir un sistema de algoritmo para obtener de combinaciones sinérgicas de ingredientes focalizados a una aplicación en la piel.

Materiales y Métodos

1. Instalación del entorno

La aplicación INCOS se desarrolló en un entorno con sistema operativo Microsoft Windows 10. Para utilizar idénticos entornos de desarrollo local y de producción, se instalaron máquinas virtuales en los equipos de desarrollo para ejecutar el código en un sistema operativo Linux, Ubuntu 18.04, con PHP 7 y MySQL 5.

El software seleccionado para utilizar las máquinas virtuales fue Oracle VM versión 6.1. VirtualBox (https://www.virtualbox.org), se descargó y se instaló el programa, siguiendo los pasos correspondientes descritos en la figura 2.1.1.

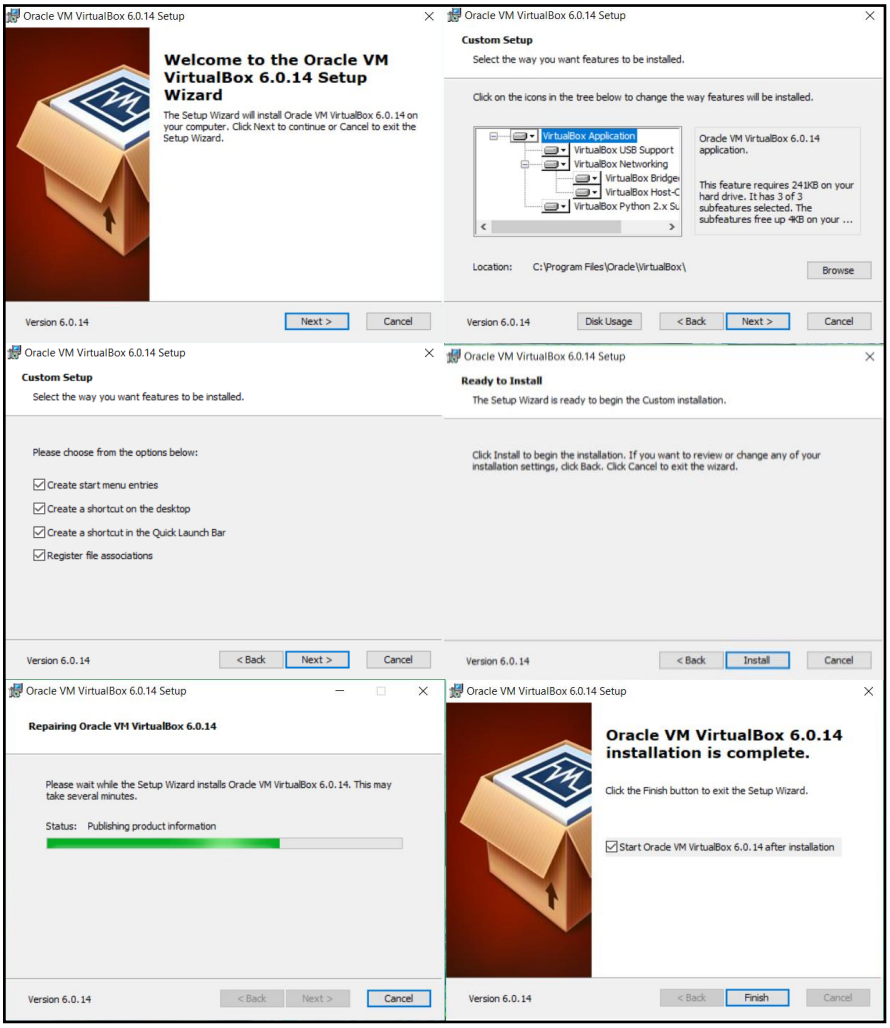


Figura 2.1.1. Pasos a seguir para la instalación del programa VirtualBox.

Posteriormente, se revisaron los parámetros de configuración de la máquina virtual, detallados en la figura 2.1.2.

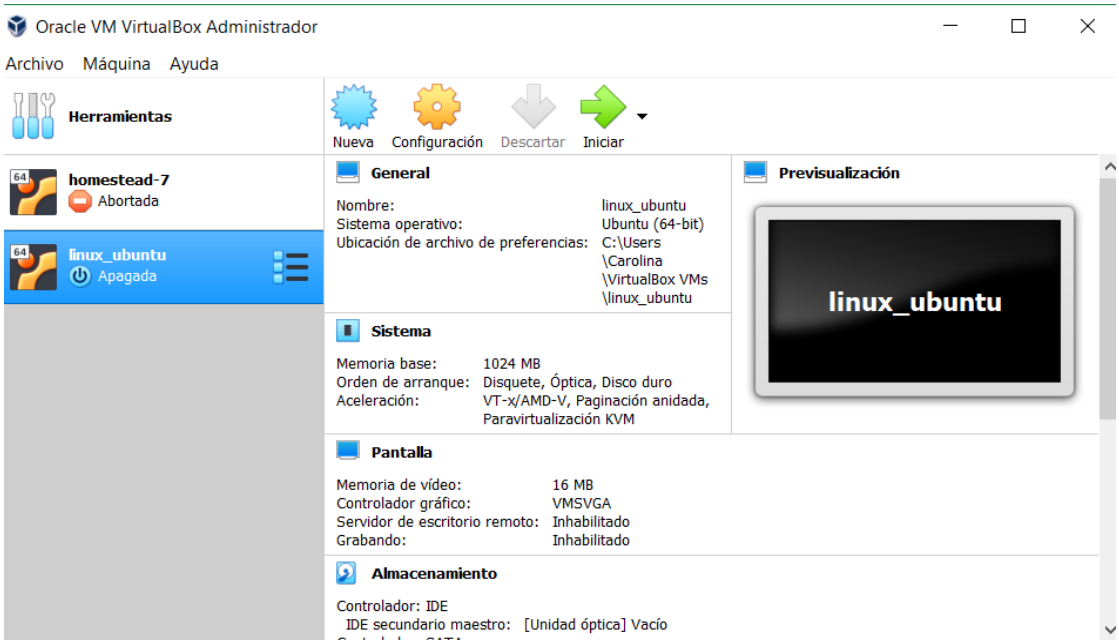


Figura 2.1.2. Visualización e instalación de los parámetros del programa VirtualBox.

Se utilizaron máquinas virtuales de 64 bits tanto en el entorno de desarrollo anfitrión como del huésped.

2. Entorno de Desarrollo Integrado

El entorno de desarrollo integrado (término conocido como IDE por sus siglas en inglés, *Integrated Development Environment*) que se utilizó fue Sublime Text. Se usaron consolas de comandos para correr diferentes utilidades dentro del IDE y facilitar el desarrollo del código, así como “plugins” o paquetes específicos para dicho IDE.

Sublime Text fue elegido por su versatilidad para dar soporte a diferentes lenguajes de programación, por su capacidad de personalización y por su mayor versatilidad ante el uso de herramientas externas.

Sublime Text fue descargado e instalado conforme a las indicaciones de la página original (https://www.sublimetext.com), siguiendo los pasos sugeridos por defecto por parte del desarrollador.

Además, se instalaron una serie de herramientas dentro del IDE (“plugins” o paquetes), con la finalidad de que dichas extensiones dotaran de nuevas características al entorno y facilitaran su uso y posterior desarrollo del proyecto.

Para añadir cualquier "plugin" lo primero fue instalar el paquete de control. Para ello se utilizó en menú "*View*" – "*Show Console*" y se pegó en la terminal mostrando el código que aparece en la página web: https://packagecontrol.io/installation. Tras este proceso, se reinició Sublime Text (figura 2.2.1.), procediéndose a instalar extensiones desde el menú.

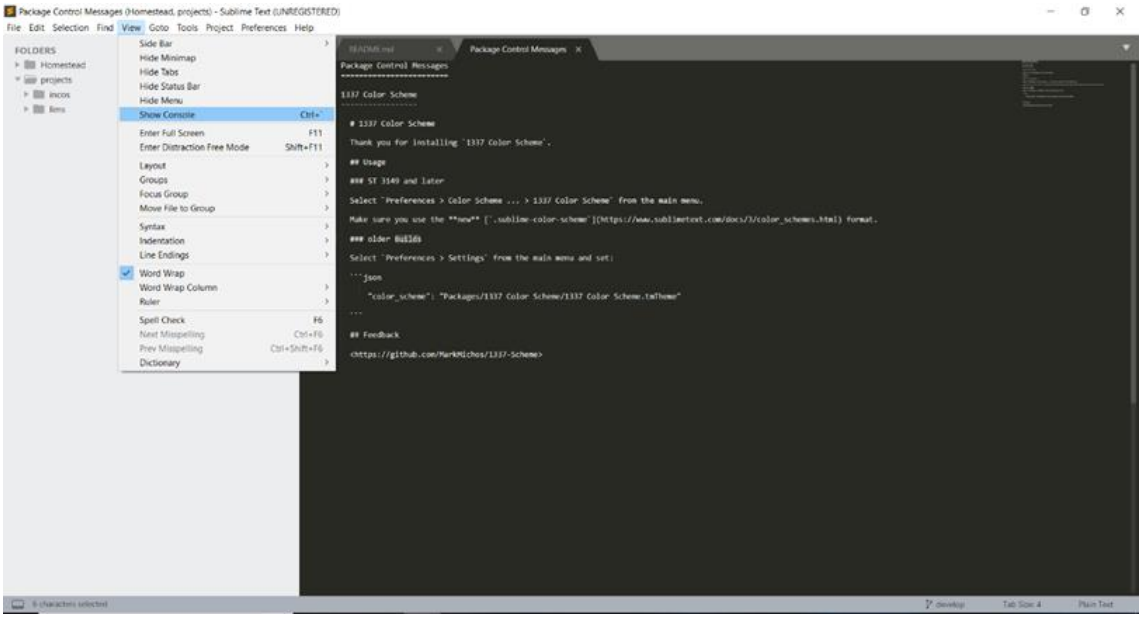


Figura 2.2.1. Instalación de paquete de control en el programa SublimeText.

Una vez instalado el paquete de control, se accedió a la utilidad de instalación de extensiones mediante la combinación de las teclas CTRL+SHIFT+P, o seleccionando "*Preferences*", "*Package Control*". Posteriormente, se utilizó el buscador de extensiones integrado, introduciendo el nombre o las iniciales del paquete a instalar (figura 2.2.2.).

A continuación, se dejó una lista de las extensiones instaladas en nuestro entorno de programación, y utilizadas durante toda la fase de desarrollo del proyecto:

- Sidebar Enhancement: Utilizado para otorgar nuevas funcionalidades a la barra lateral y mejorar sustancialmente el uso de los archivos.
- BracketHighlighter: Utilizado para resaltar las etiquetas de apertura y cierre del código, mejorando la lectura.
- Alignment: Utilizado para alinear de forma automática bloques completos de código.

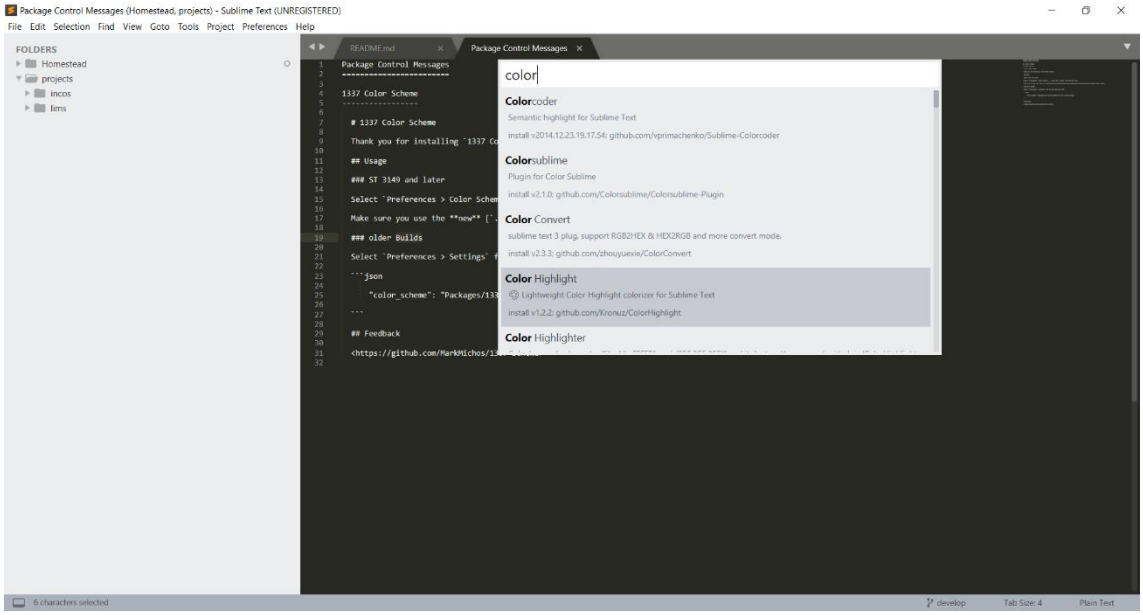


Figura 2.2.2. Instalación de cada "plugin" en el programa SublimeText.

3. Seguimiento y control de versiones de código

Con el objetivo de mantener un control de los cambios elaborados en el software, se utilizó el software de código libre Git. Git fue diseñado como software de control de versiones con gestión mediante línea de comandos.

Para simplificar la curva de aprendizaje de las utilidades proporcionadas por Git, se usó una herramienta con interfaz gráfica para nuestro repositorio llamada SmartGit.

Mediante dichas herramientas, se cumplieron unos estándares de calidad y revisión de código proporcionado por el seguimiento de versiones. Adicionalmente, se utilizó el sistema de gestión de versiones como posible copia de seguridad en entornos distribuidos, diferentes ordenadores de desarrollo local, y despliegues de servidores en la nube.

4. Repositorio de almacenamiento de código

El código desarrollado se almacenó en un repositorio centralizado y distribuido. Para ello, se eligió el proveedor en la nube GitLab, ya que permite la gestión de repositorios. Se creó una cuenta en dicho proveedor, y una vez activada la cuenta, se generó un proyecto con su nombre. Se escribió el nombre del proyecto (figura 2.4.1), se determinó en privado y se inicializó el repositorio con un archivo en formato markdown denominado README.md.,

en el cual se escribieron los comandos para inicializar el proyecto. Este documento es esencial para clonar el proyecto siempre que sea necesario.

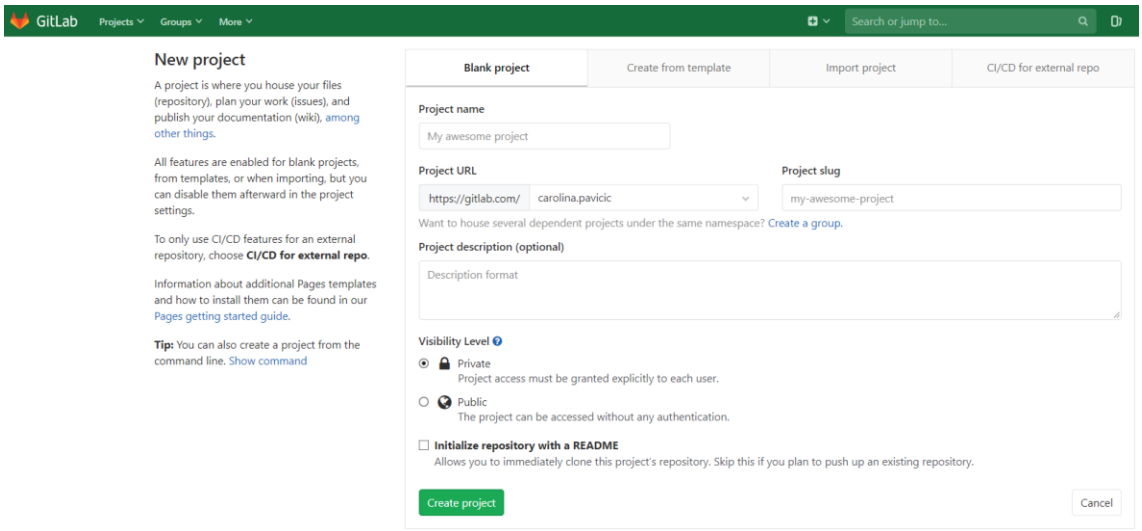


Figura 2.4.1. Creación de un repositorio en GitLab.

Tras iniciar el repositorio, se utilizó el programa SmartGit instalado en nuestro ordenador con el objetivo de subir el código a la nube. Se descargó e instaló SmartGit procedente de la página https://www.syntevo.com/smartgit/download. Finalmente, SmartGit fue conectado en GitLab, utilizando el protocolo HTTPS para poder realizar el clonado del proyecto (figura 2.4.2).

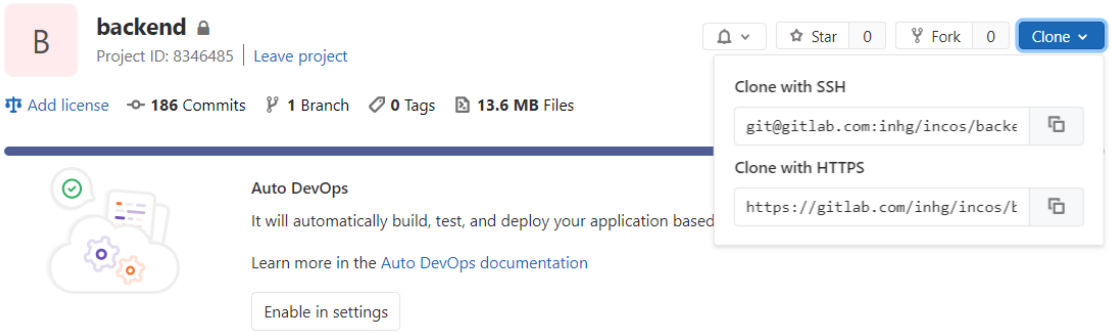


Figura 2.4.2. Conexión del proyecto en GitLab con Smartgit.

Posteriormente, en SmartGit se clonó el repositorio utilizando el menú superior "Repository" – "Clone" (figura 2.4.3.). Una vez realizado, el repositorio local apareció en el lado izquierdo del programa para realizar el seguimiento de los cambios que se produjeran en el mismo.

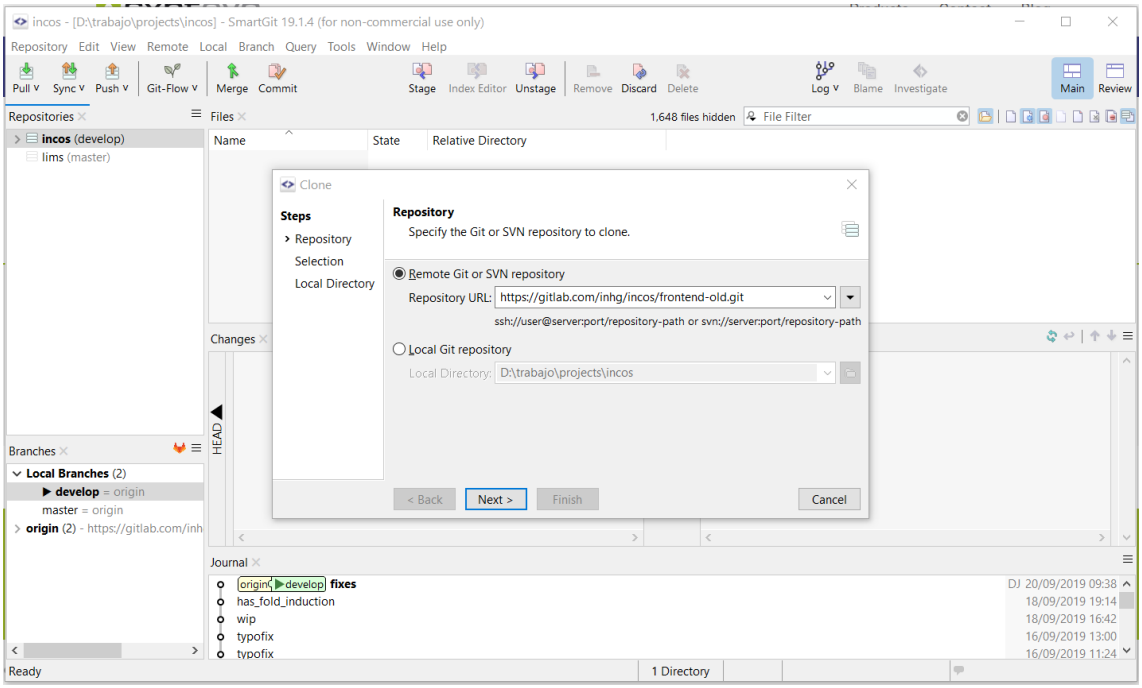


Figura 2.4.3. Clonación de un repositorio en SmartGit.

5. Sistema de Gestión de Bases de Datos

Para poder almacenar y trabajar con los datos generados en nuestra aplicación, se utilizó el motor de bases de datos MySQL. Este motor es un sistema de gestión de bases de datos relacional muy extendido.

Su instalación se realizó en el entorno de desarrollo virtualizado dentro de la máquina VirtualBox, bajo el sistema operativo Ubuntu. En dicho sistema solo se instaló el servidor de las bases de datos, mientras que en el ordenador huésped se instalaron dos programas clientes de MySQL para poder conectarse con el mismo.

6. Programas Cliente para el acceso a Bases de Datos

Para poder acceder a las bases de datos se utilizaron dos programas distintos. El programa HeidiSQL, utilizado para la visualización de la base de datos, tanto la estructura (tablas y vistas), como los datos incluidos. Con esta herramienta se pudo comprobar que los datos incluidos eran correctos y posibles de ser exportados para ser comparados con otros formatos.

HeidiSQL fue descargada e instalada desde de su página web https://www.heidisql.com/download.php (figura 2.6.1.), siguiendo los pasos correspondientes (Figura 2.6.2.).

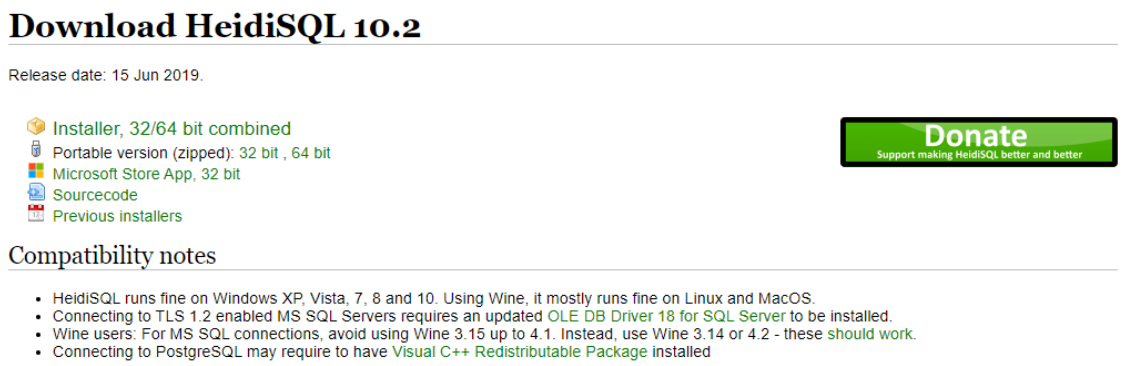


Figura 2.6.1. Descarga del programa HeidiSQL.

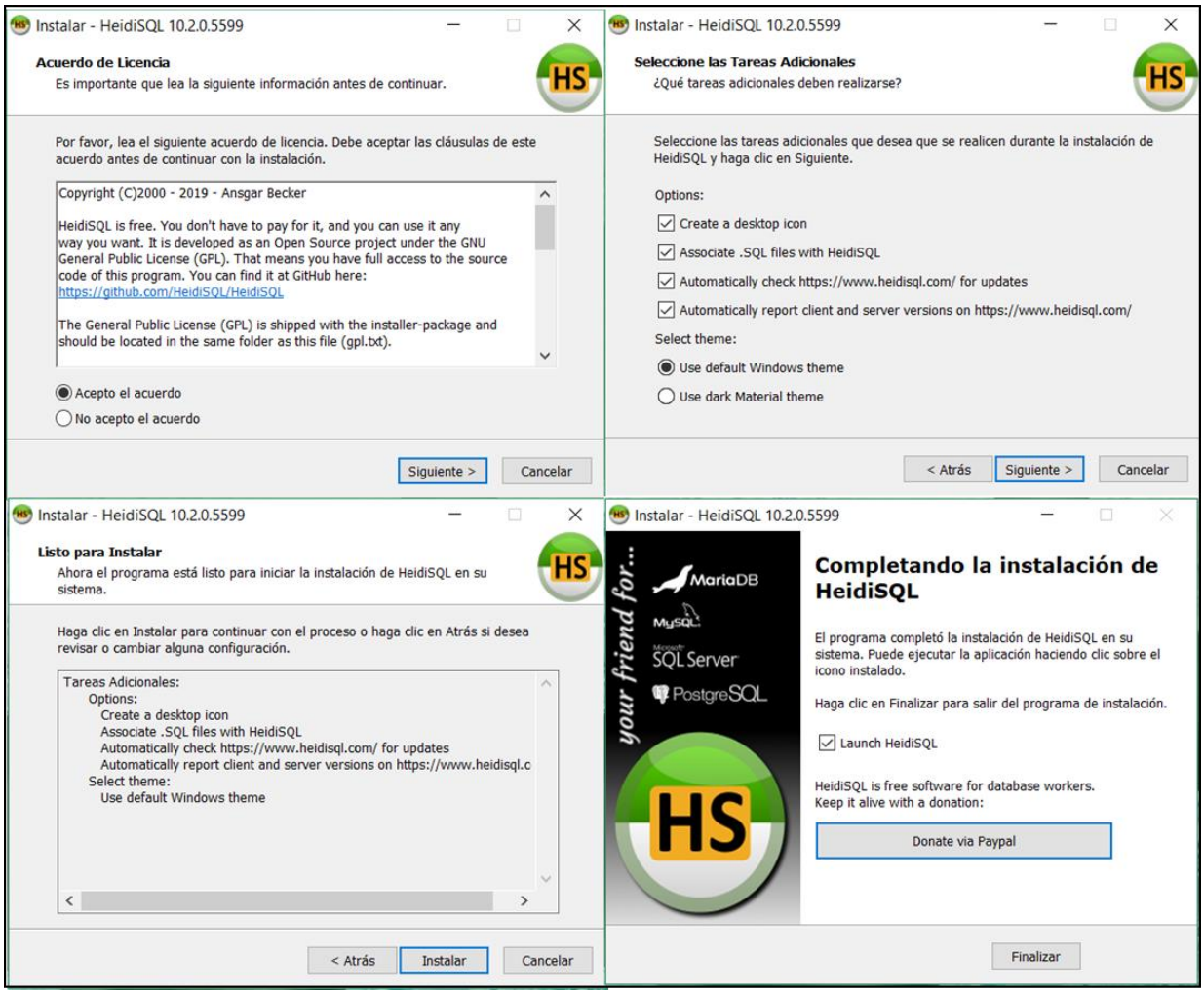


Figura 2.6.2. Pasos para la instalación del programa HeidiSQL.

El segundo programa utilizado como cliente de acceso a base de datos fue MySQL Workbench. A pesar de que dicha herramienta también permitía visualizar la estructura y contenido de las tablas de la base de datos, su experiencia era notablemente peor que la base de HeidiSQL. No obstante, este software se utilizó para generar un UML (*Unified Modeling Language*) con el diagrama de Entidad-Relación de nuestra base de datos.

Este software fue descargado desde la página oficial de MySQL (figura 2.6.3.), e instalado obteniendo el archivo de la página oficial de Oracle (https://dev.mysql.com/downloads/workbench/), siguiendo los pasos correspondientes (figura 2.6.4.).

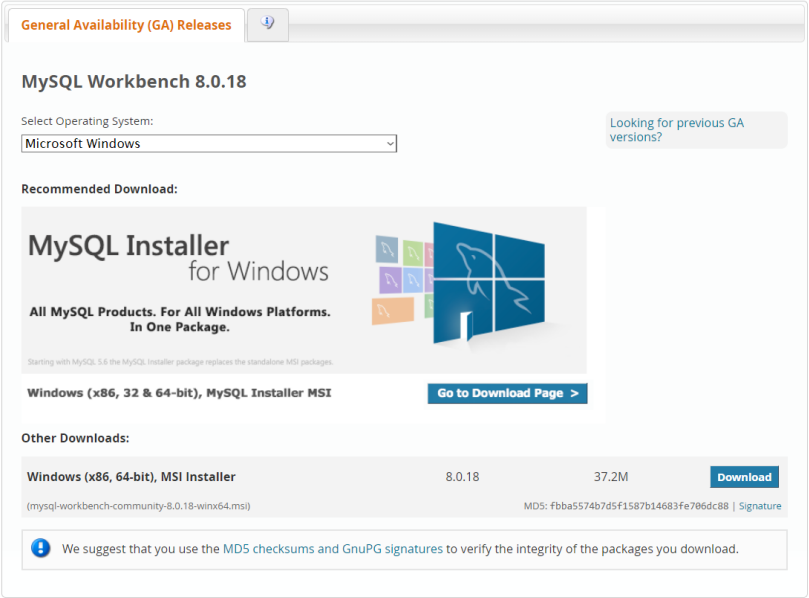


Figura 2.6.3. Descarga del programa MySQL.

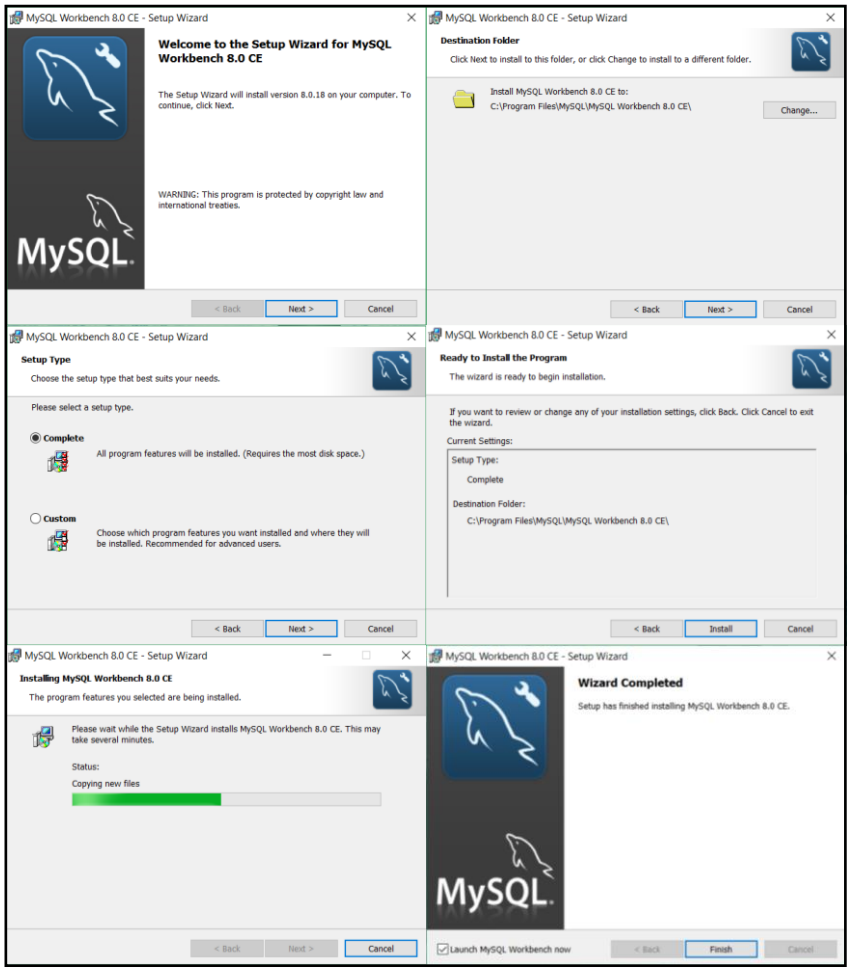


Figura 2.6.4. Pasos para la instalación del programa MySQL Workbench.

7. Configuración del anfitrión para la máquina virtual

Para poder modificar los sistemas de resolución de DNS en el sistema operativo local y poder desarrollar simulando un dominio existente, fue necesario modificar el archivo "hosts" de la máquina huésped. Para ello, se utilizó el programa Notepad++ en modo administrador, siendo descargado desde su web https://notepad-plus-plus.org/downloads/v7.8.1/ (figura 2.7.1.). Una vez descargado, fue instalado siguiendo los pasos requeridos (figura 2.7.2.).

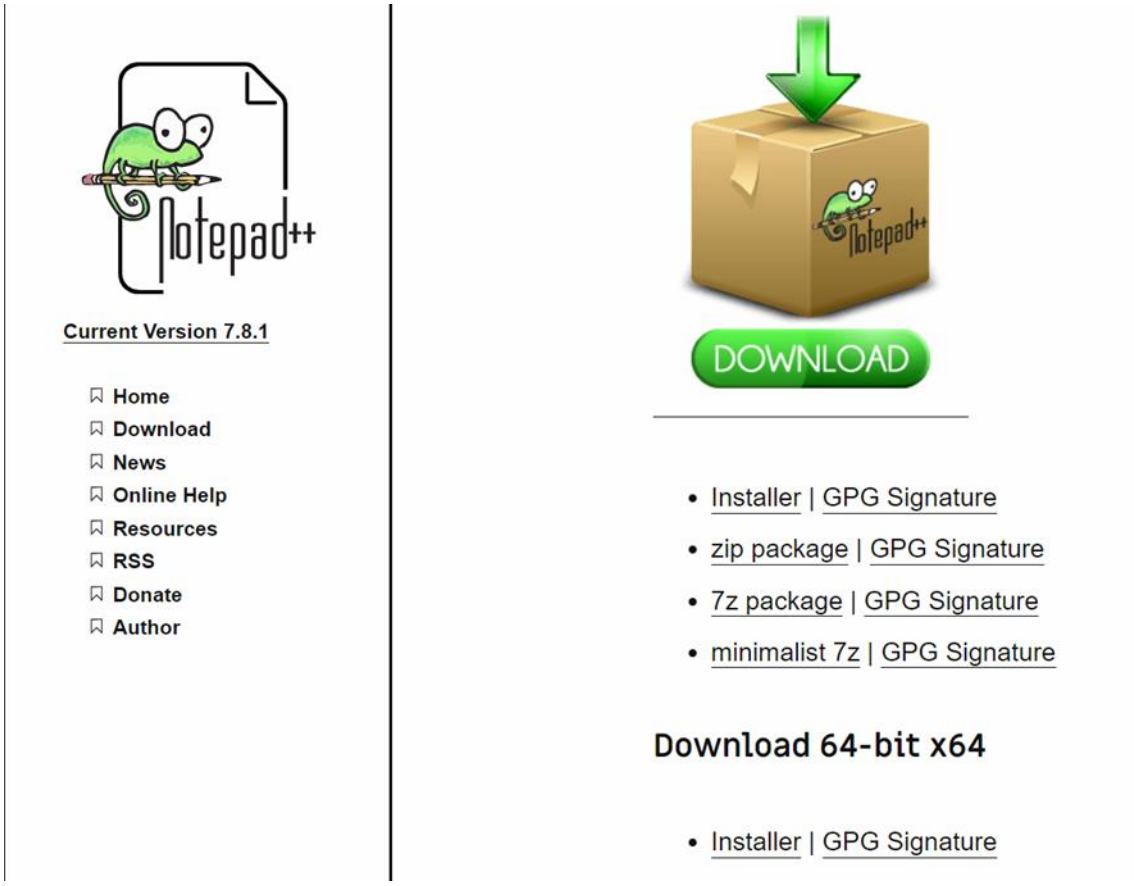


Figura 2.7.1. Descarga del programa Notepad++.

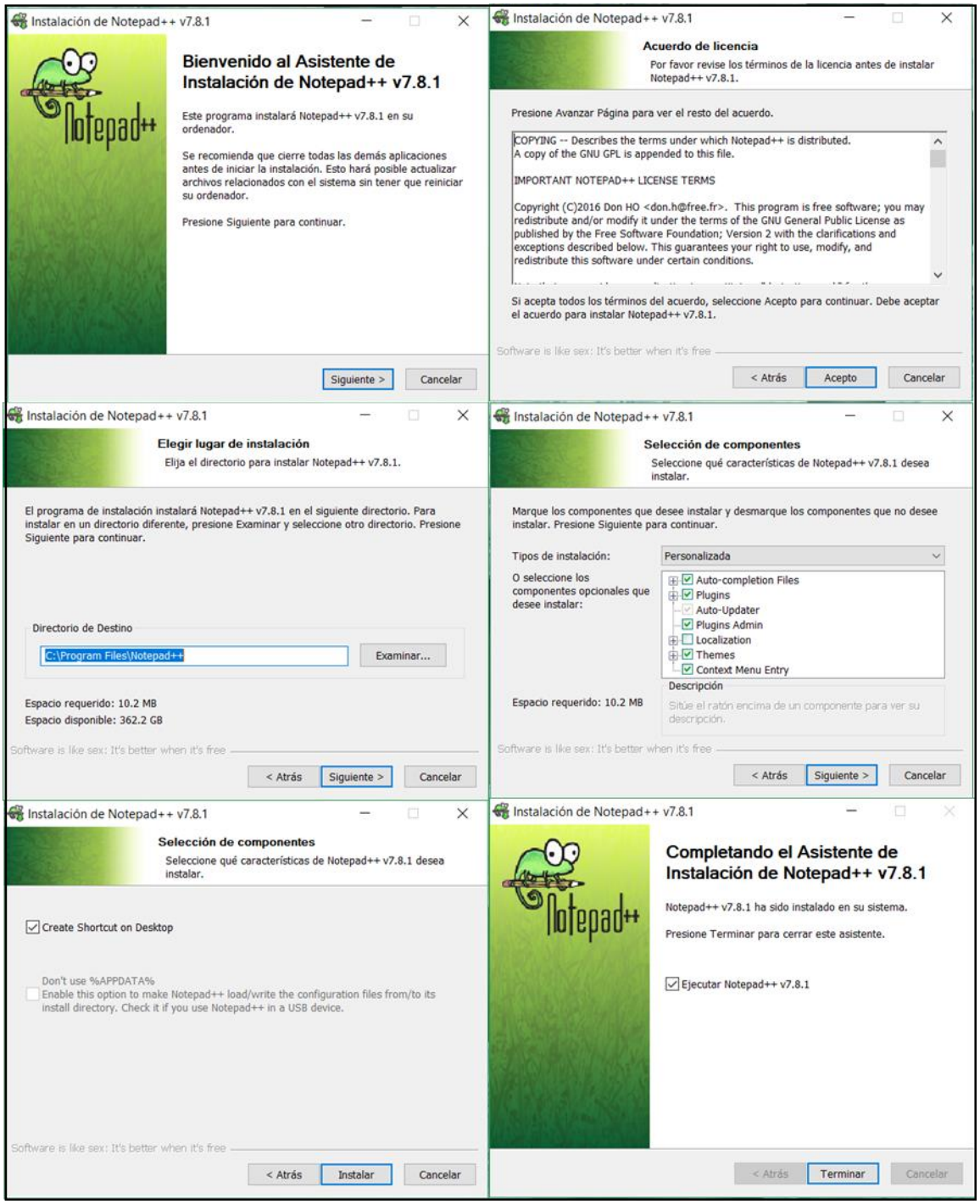


Figura 2.7.2. Pasos para la instalación del programa Notepad++.

Una vez instalado, se abrió el archivo hosts de la máquina Windows localizado en la ruta "C:\Windows\ System32\drivers\etc\hosts", y se introdujo la dirección 192.168.10.10 (expuesta mediante la máquina VirtualBox) para que respondiera a peticiones de nuestro dominio personalizado.

8. Configuración del huésped para la máquina virtual

Como se ha explicado, se utilizó VirtualBox como sistema de virtualización de máquinas para tener un entorno de desarrollo estable independientemente del entorno real de programación.

Para desplegar una máquina dentro de VirtualBox, se utilizó Vagrant, que es un repositorio de imágenes preparadas para ser desplegadas en entornos como VirtualBox, eligiendo la imagen Laravel Homestead, debido a que es la máquina oficial ofrecida por el framework de programación utilizado en el desarrollo del proyecto.

La imagen Laravel Homestead fue instalada con todos los programas necesarios para el desarrollo del proyecto. Dicha imagen tiene un sistema operativo Linux Ubuntu con los siguientes programas: Git, PHP, Nginx, MySQL, Sqlite, PostgreSQL, Composer, Node (Yarn, Bower, Grunt, Gulp), Redis, Memcached, Beanstalkd, Mailhog, avahi, ngrok, Xdebug, XHProf, y wp-cli.

La misma imagen utilizada en el entorno virtualizado para el desarrollo en local se usó para el despliegue en un entorno de producción, eliminando los riesgos asociados al despliegue en diferentes infraestructuras.

Para poder utilizar dicha imagen, primero se instaló la utilidad de imágenes para la máquina virtual descargándola desde su página web oficial (https://www.vagrantup.com, Figura 2.8.1), siguiendo los pasos necesarios (Figura 2.8.2.).

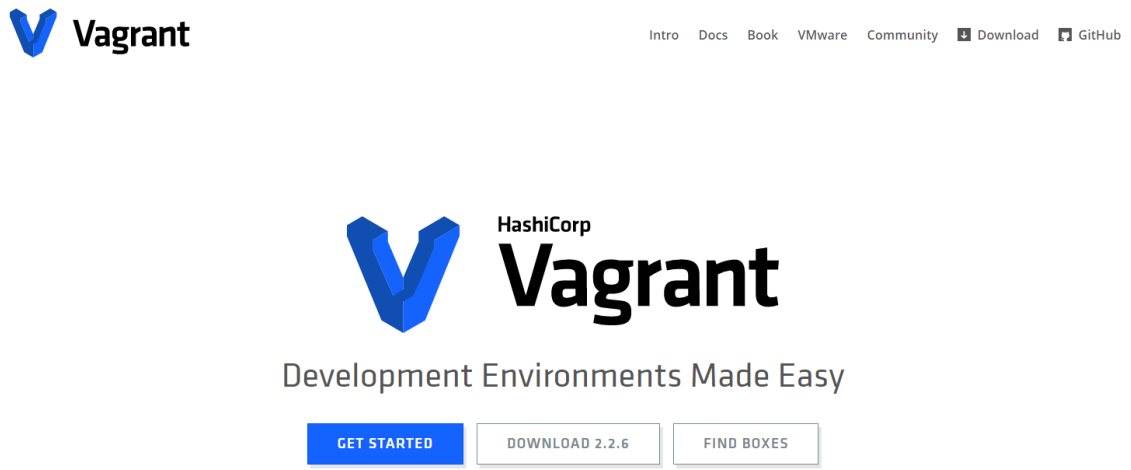


Figura 2.8.1. Descarga e instalación del programa Vagrant.

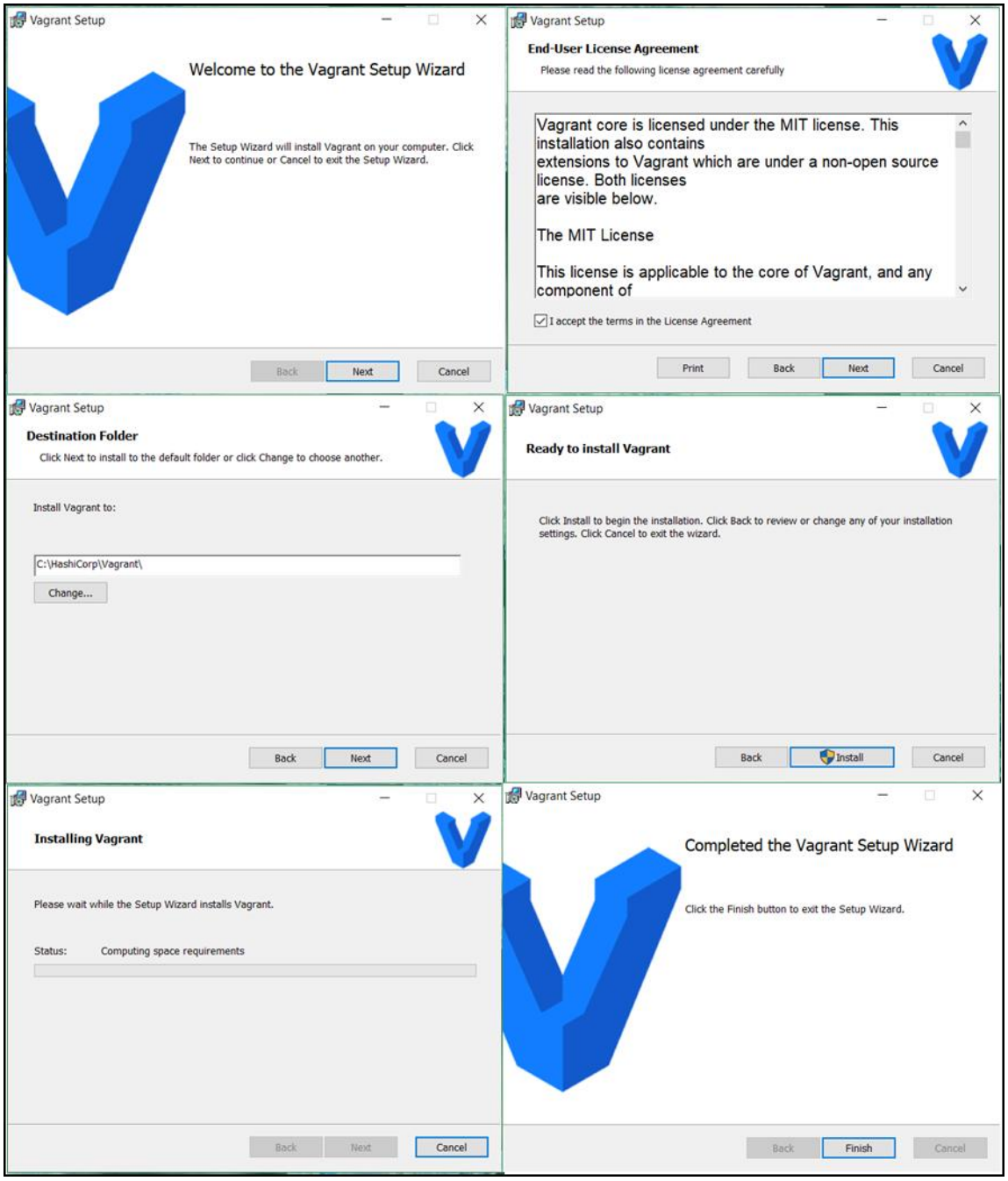


Figura 2.8.2. Pasos para la instalación del programa Vagrant.

En un segundo paso, se desplegó la imagen Laravel Homestead, el sistema operativo con sus programas, mediante Vagrant, recién instalado. Para ello, fueron seguidos los pasos indicados en la página web (https://laravel.com/docs/6.x/homestead).

Inicialmente, se abrió una terminal como administrador en nuestro ordenador Windows. En dicha terminal se introdujeron los comandos necesarios para instalar y utilizar la máquina virtual, de la siguiente manera:

Se descargó la imagen de Laravel Homestead mediante Vagrant:

- vagrant box add laravel/homestead

Se descargó el proyecto Laravel homestead en una carpeta local llamada “homestead”, e iniciamos sus utilidades para usar el entorno virtualizado:

- git clone https://github.com/laravel/homestead.git ~/Homestead
- cd ~/Homestead
- init.bat (en el caso del entorno de programación windows)

Tras realizar estos pasos, se configuró “Homestead” para conectar la base de datos y la estructura de carpetas generando túneles y carpetas compartidas entre el sistema anfitrión y el sistema huésped.

Para ello, con Notepad ++, fue editado el archivo homestead.yaml situado dentro de la carpeta “Homestead” mencionada anteriormente. Dentro del archivo se utilizó la configuración que aparece en la figura 2.8.3.

```
1   ---
2   ip: "192.168.10.10"
3   memory: 4096
4   cpus: 1
5   provider: virtualbox
6
7   authorize: ~/.ssh/id_rsa.pub
8
9   keys:
10      - ~/.ssh/id_rsa
11
12  folders:
13      - map: D:/trabajo/projects
14        to: /home/vagrant/code
15
16  sites:
17      - map: lims.test
18        to: /home/vagrant/code/lims/public
19      - map: incos.test
20        to: /home/vagrant/code/incos/public
21
22  databases:
23      - incos
24      - lims
25
```

Figura 2.8.3. Configuración del sistema “Homestead” mediante el archivo Homestead.yaml.

Adicionalmente, se modificó el archivo hosts de Windows para introducir una resolución de DNS de forma manual (figura 2.8.4.). Debido a ello, se pudo realizar un acceso local a la web mediante nombres de dominio, pero no mediante IPs directas con diferentes puertos.

Así mismo, se modificó el archivo ".env" de nuestro proyecto con las variables de entorno (base de datos, usuarios y contraseñas) (figura 2.8.5.).

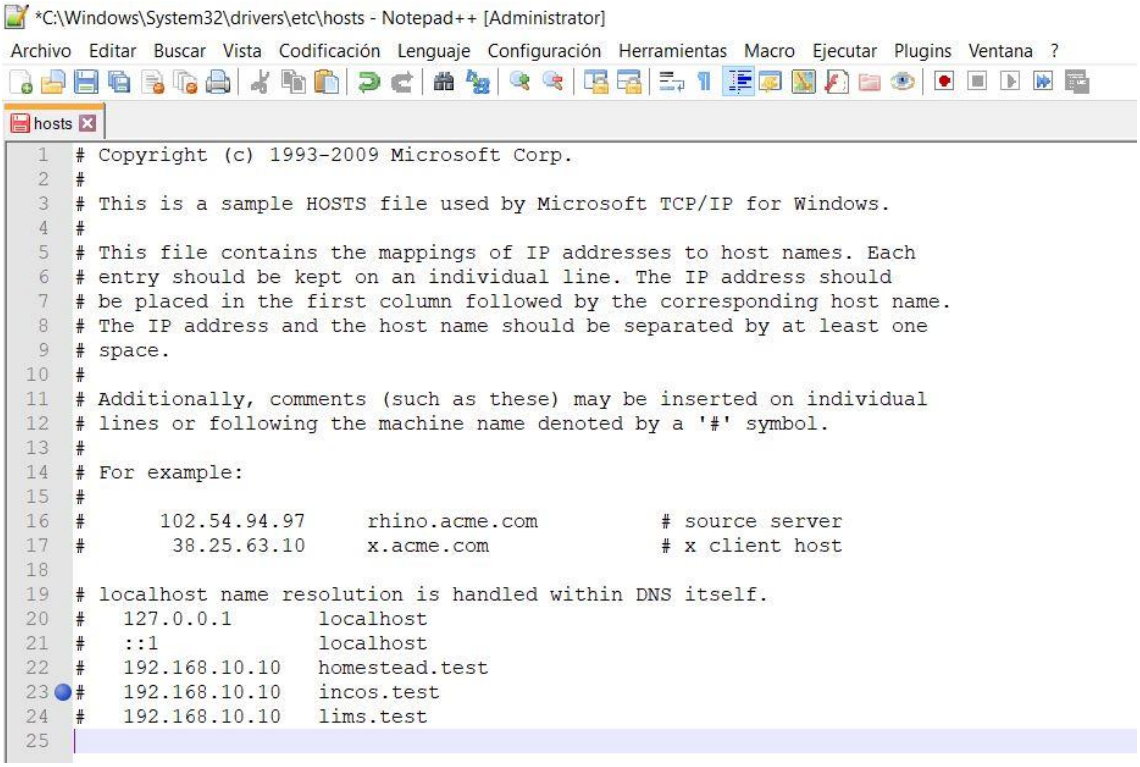


Figura 2.8.4. Modificación de archivo hosts para obtener acceso local a la web.

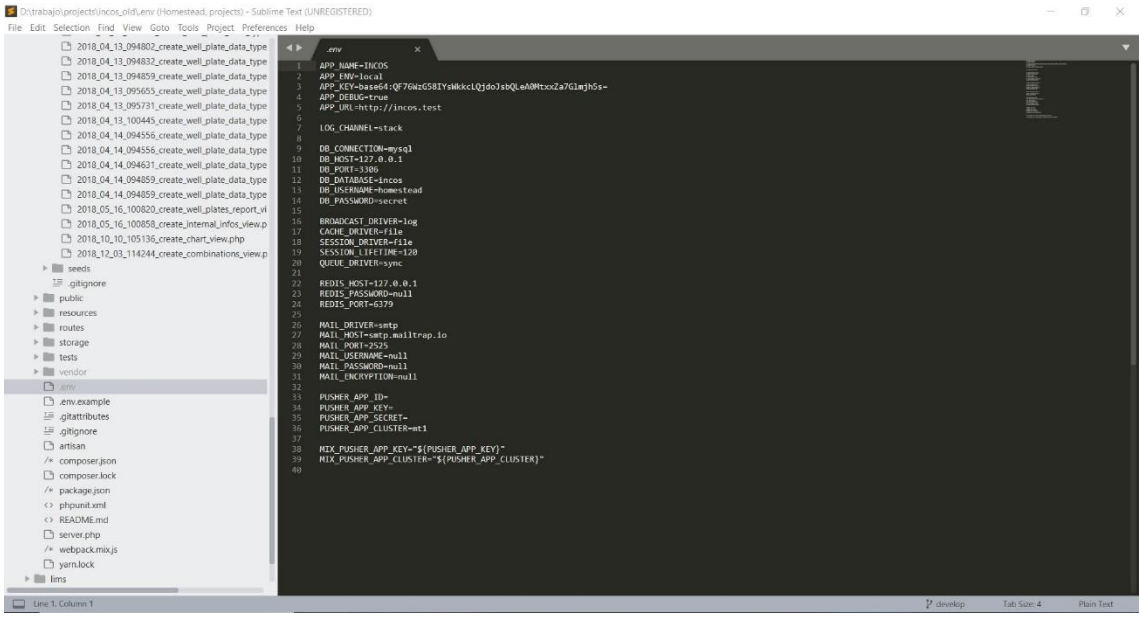


Figura 2.8.5. Modificación de variables del entorno en archivo ".env" de nuestro proyecto.

9. Utilización del sistema de desarrollo virtualizado

Una vez realizados los cambios descritos anteriormente, procedimos a arrancar la máquina huésped introduciendo los siguientes comandos en la terminal:

- vagrant up
- vagrant ssh

Finalmente, mediante la utilidad "composer" ya preinstalada en la máquina virtual, fueron descargados los paquetes y librerías necesarias de nuestro framework, introduciendo en la terminal los comandos:

- composer install
- composer dump-autoload

La base de datos fue conectada con el programa MySQL Workbench y HeidiSQL haciendo uso del túnel entre puertos 3306 de la máquina huésped y el puerto 33060 de la máquina anfitrión (figura 2.9.1.):

- Conexión: 127.0.0.1
- Puerto: 33060 (nuestra configuración de Vagrant hace un túnel local del puerto 33060 al puerto 3306 de MySQL de la máquina virtual).
- Usuario: homestead
- Contraseña: secret

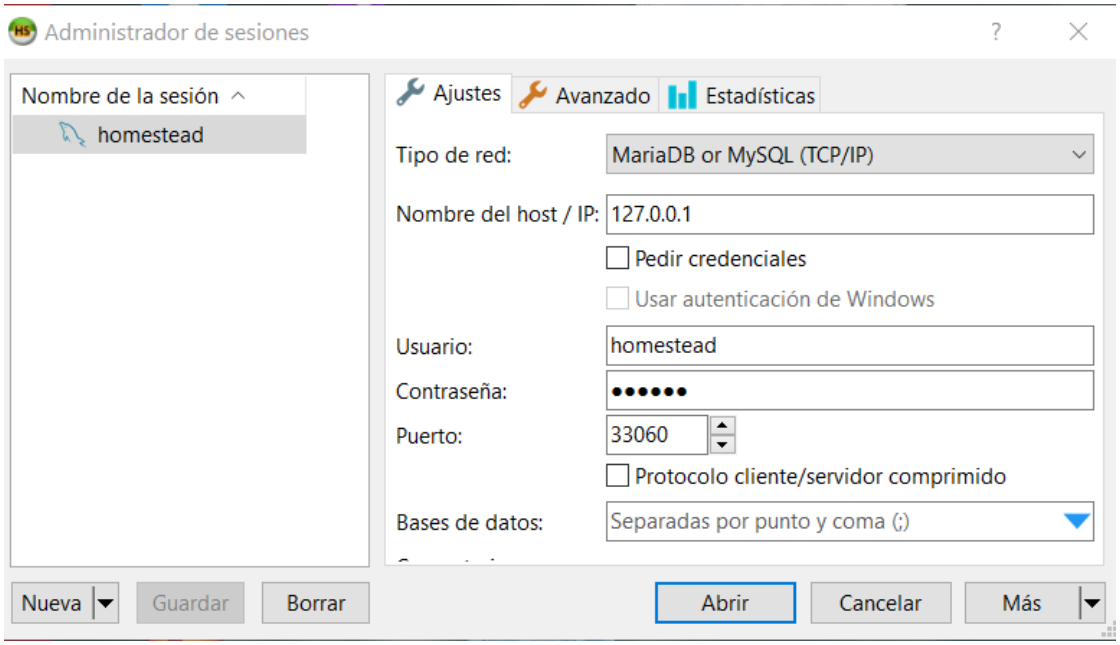


Figura 2.9.1. Introducción de datos para la conexión con el programa HeidiSQL.

Finalmente, se añadió la carpeta clonada mediante Git a un proyecto nuevo en Sublime Text. Para poder usar las utilidades de la terminal de comandos, nos situamos en la carpeta del proyecto cambiando el directorio de la misma con el siguiente comando:

- cd incos

Una vez realizados estos pasos, todo el sistema de desarrollo estuvo listo para poder desarrollar el código de nuestro proyecto.

10. Estructura de los archivos del frameworks Laravel

El framework se utilizó fue Laravel. Dicho framework usa el patrón MVC (Modelo, Vista y Controlador), patrón de arquitectura de software, utilizado para separar los datos de la lógica de la estructura, ayudando a solventar los errores de una manera más rápida y eficaz, sin repetir información y pudiendo reutilizar el código en cualquier punto de la estructura del proyecto.

El modelo corresponde a la estructura de los datos, la vista corresponde a la parte gráfica que muestra la información al usuario, y el controlador corresponde a la conexión entre el modelo y la vista, gestionando las peticiones del navegador.

La estructura de archivos utilizada fue la propuesta originalmente por el framework (figura 2.10.1.).

En la carpeta “app” se situó todo el código principal desarrollado por nuestro grupo para la aplicación.

En la carpeta “database” se situó la información de la estructura de datos y los datos, necesarios para migrar la base de datos y mantener dicha información en un repositorio git, de modo que sea replicable en cualquier máquina donde se desplegase el proyecto.

Finalmente, en las carpetas “public” y “resources” se situó la información relacionada con la vista.

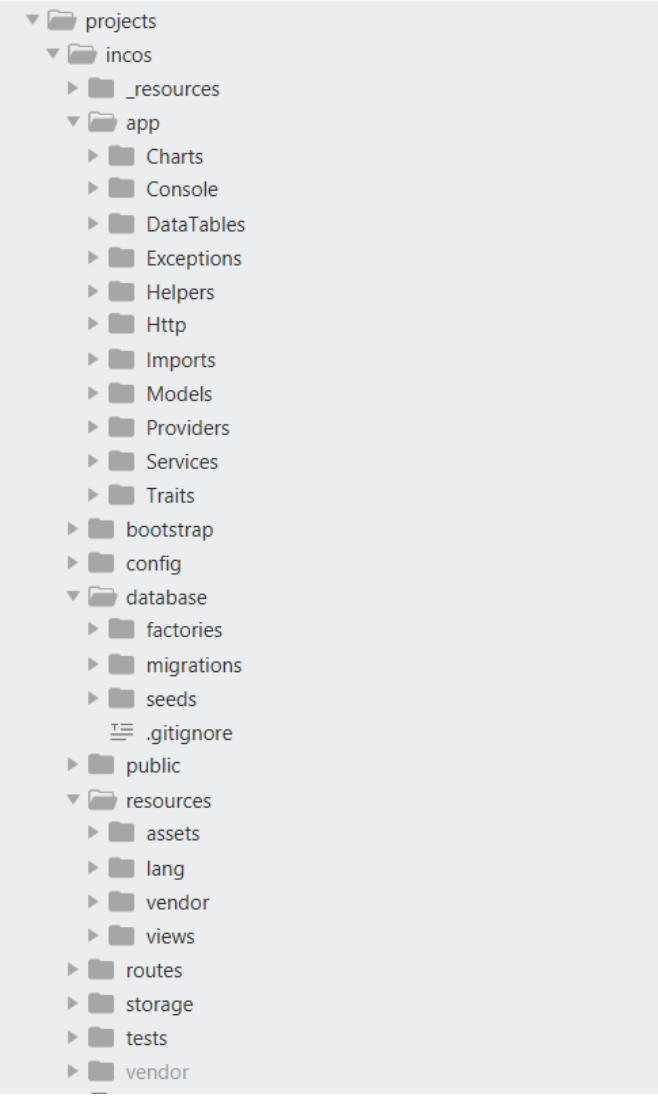


Figura 2.10.1. Estructura de los archivos del proyecto.

11. Fuentes de datos internos y externos

Para alimentar la base de datos se utilizaron bases de datos públicas y fuentes de datos generados por la plataforma interna SimDerma.

Se realizó una adaptación de nuestra estructura de bases de datos para importar los datos de estructuras externas mediante APIs (*Application Programming Interface*) de programación. Para importar las bases de datos con datos públicos, se necesitó conocer y adaptar la estructura de datos que se querían obtener y así realizar las conexiones de obtención de datos. Nuestras bases de datos públicas son CosIng (*Cosmetic Ingredient Database),* PubChem y PubMed.

CosIng es una base de datos oficial de la Unión Europea de la que se obtuvieron todos los datos de cada uno de los ingredientes, su INCI (Ingredient Nomenclature of Cosmetic Ingredient), aplicaciones, restricciones y limitaciones de uso.

PubChem es una base de datos de la que se obtuvo toda la información química de los compuestos, desde las nomenclaturas IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), SMILES (*Simplified Molecular-Input Live-Entry System*), estructura, propiedades físicas, peso molecular y datos de descripción de propiedades.

PubMed es una base de datos de referencias de la que se obtuvo información pública de experimentos, compuestos químicos, ingredientes y aplicaciones cosméticas. De donde se va a basar parte de la teoría de los datos.

La estructura de la base de datos de nuestra aplicación se basó tanto en esta información como en la información generada por nuestro laboratorio, complementando ambas partes. Con ello, se ha complementado la información de cada aspecto de los ingredientes aplicados al uso tópico.

RESULTADOS

1. Contexto de herramienta

INCOS (*INgredient COmbinatorial System*) se ha diseñado como una primera herramienta para la introducción de información genérica de ingredientes y sus actividades biológicas y para proponer combinaciones de estos ingredientes en aplicaciones cosméticas específicas. La herramienta se basó en una base de datos (DB o *Database*) en formato XML (*Extensible Markup Language* o lenguaje de etiquetas), y la parte gráfica se diseñó en Java. Este sistema presenta varios problemas, la base de datos en archivos XML (figura 3.1.1.) tiene una capacidad de almacenamiento de información limitada, ya que a mayor cantidad de datos el programa se enlentece. Además, la base de datos en formato fichero está situada en una nube para poder tener acceso al programa desde diferentes puntos, generando un problema añadido de seguridad.


```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
- <scb:Indications xmlns:xsi="http://www.w3.org/2001/XMLSchema-instance" xmlns:scb="www.simcosmetic.com/xml/indication"
  xsi:schemaLocation="www.simcosmetic.com/xml/indication ../schemas/indications.xsd ">
    - <scb:Indication>
        <scb:id>Anti-Aging</scb:id>
        <scb:description>Description of the indication...</scb:description>
      - <scb:experimentalModel>
          <scb:experiment>Proliferation in fibroblasts (48h)</scb:experiment>
          <scb:reference>Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. J Clin Invest. 2004 Jan; 113(1):8-13. </scb:reference>
          <scb:reference>Kim YM, Jung HJ, Choi JS, Nam TJ. Anti-wrinkle effects of a tuna heart H2O fraction on Hs27 human fibroblasts. Int J Mol Med. 2016 Jan; 37(1):92-8. </scb:reference>
          <scb:reference>Żerańska J, Pasikowska M, Szczepanik B, Mlosek K, Malinowska S, Dębowska RM, Eris I. A study of the activity and effectiveness of recombinant fibroblast growth factor
            (Q40P/S47I/H93G rFGF-1) in anti-aging treatment. Postepy Dermatol Alergol. 2016 Feb; 33(1):28-36. </scb:reference>
          <scb:reference>Kim YM, Huh JS, Lim Y, Cho M. Soy Isoflavone Glycitin (4'-Hydroxy-6-Methoxyisoflavone-7-D-Glucoside) Promotes Human Dermal Fibroblast Cell Proliferation and
            Migration via TGF-β Signaling. Phytother Res. 2015 May; 29(5):757-69. </scb:reference>
          <scb:reference>Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L, Forbes-Hernandez TY, Gasparrini M, Gonzàlez-Paramàs AM, Santos-Buelga C, Quiles JL, Bompadre S, Mezzetti B, Battino M.
            Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. Molecules. 2014 Jun
            11; 19(6):7798-816. </scb:reference>
          <scb:reference>Taniguchi M, Arai N, Kohno K, Ushio S, Fukuda S. Anti-oxidative and anti-aging activities of 2-O-α-glucopyranosyl-L-ascorbic acid on human dermal fibroblasts. Eur J
            Pharmacol. 2012 Jan 15; 674(2):126-31. </scb:reference>
          <scb:reference>Manosroi A, Jantrawut P, Akihisa T, Manosroi W, Manosroi J. In vitro anti-aging activities of Terminalia chebula gall extract. Pharm Biol. 2010 Apr; 48(4):469-81.
            </scb:reference>
          <scb:reference>Lee KK, Choi JD. The effects of areca catechu L extract on anti-aging. Int J Cosmet Sci. 1999 Aug; 21(4):285-95. </scb:reference>
          <scb:reference>Park HY, Youm JK, Kwon MJ, Park BD, Lee SH, Choi EH. K6PC-5, a novel sphingosine kinase activator, improves long-term ultraviolet light-exposed aged murine skin. Exp
            Dermatol. 2008 Oct; 17(10):829-36. </scb:reference>
          <scb:reference>Tran TA, Ho MT, Song YW, Cho M, Cho SK. Camphor Induces Proliferative and Anti-senescence Activities in Human Primary Dermal Fibroblasts and Inhibits UV-Induced
            Wrinkle Formation in Mouse Skin. Phytother Res. 2015 Dec; 29(12):1917-25. </scb:reference>
          <scb:reference>Gallo D, Dillemans M, Allardin D, Priem F, Van Nedervelde L. Trophic effect of a methanol yeast extract on 3T3 fibroblast cells. J Cosmet Sci. 2014 Nov-Dec; 65(6):389-
            401. </scb:reference>
          <scb:reference>Han DW, Lee MH, Kim B, Lee JJ, Hyon SH, Park JC. Preventive effects of epigallocatechin-3-O-gallate against replicative senescence associated with p53 acetylation in
            human dermal fibroblasts. Oxid Med Cell Longev. 2012; 2012(1):850684-850684. </scb:reference>
          <scb:reference>Giovannelli L, Pitozzi V, Jacomelli M, Mulinacci N, Laurenzana A, Dolara P, Mocali A. Protective effects of resveratrol against senescence-associated changes in cultured
            human fibroblasts. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2011 Jan; 66(1):9-18. </scb:reference>
        </scb:experimentalModel>
      - <scb:experimentalModel>
          <scb:experiment>Proliferation in keratinocytes (48h)</scb:experiment>
          <scb:reference>Lorencini M, Brohem CA, Dieamant GC, Zanchin NI, Maibach HI. Active ingredients against human epidermal aging. Ageing Res Rev. 2014 May; 15(1):100-15.
            </scb:reference>
          <scb:reference>Bourguignon LY, Wong G, Xia W, Man MQ, Holleran WM, Elias PM. Selective matrix (hyaluronan) interaction with CD44 and RhoGTPase signaling promotes keratinocyte
            functions and overcomes age-related epidermal dysfunction. J Dermatol Sci. 2013 Oct; 72(1):32-44. </scb:reference>
          <scb:reference>Ma C, Li LF, Chen X. Expression of metallothionein-I and II in skin ageing and its association with skin proliferation. Br J Dermatol. 2011 Mar; 164(3):479-82.
            </scb:reference>
          <scb:reference>Cordisco S, Maurelli R, Bondanza S, Stefanini M, Zambruno G, Guerra L, Dellambra E. Bmi-1 reduction plays a key role in physiological and premature aging of primary
```


Figura 3.1.1. Archivo XML o lenguaje de etiquetas con las referencias.

Por otro lado, el componente gráfico que interactúa con el usuario presenta otras dificultades incluyendo la obsolescencia de Java. Actualmente, este tipo de programación no se utiliza para el diseño de programas debido: a) requiere de instalación previa de Java en el ordenador para instalar esta herramienta y b) cada nueva programación o actualización requiere de una reinstalación del programa. Además, el diseño de la herramienta puede resultar poco intuitivo y obsoleto para el usuario final.

En esta herramienta se incluyeron alrededor de 100 ingredientes, definiendo sus estructuras químicas, referencias bibliográficas de cada uno de ellos, y valoración de una a tres cruces (+, ++, +++) obtenida de los resultados *in vitro* en la plataforma SimDerma. Con esta

información se observaron problemas en la rapidez del programa, introducción y su obtención de datos, limitando su correcto funcionamiento.

La herramienta de combinación de ingredientes se diseñó como un método de búsqueda meta-heurístico basado en la evolución biológica. En este método se eligen muestras aleatorias de individuos y se codifican en secuencias numéricas, seleccionando los que aportan una ponderación más alta o "fitness", que viene determinada por la información situada en la DB. En cada iteración, se descartan los individuos con peor "fitness", restituyendo la muestra con nuevos individuos y recombinando los mejores calificados. Al final, de un número determinado de iteraciones se obtienen los individuos mejor calificados, como propuesta de ingredientes para una indicación determinada. En la figura 3.1.2. se observan los pasos del algoritmo descritos anteriormente.

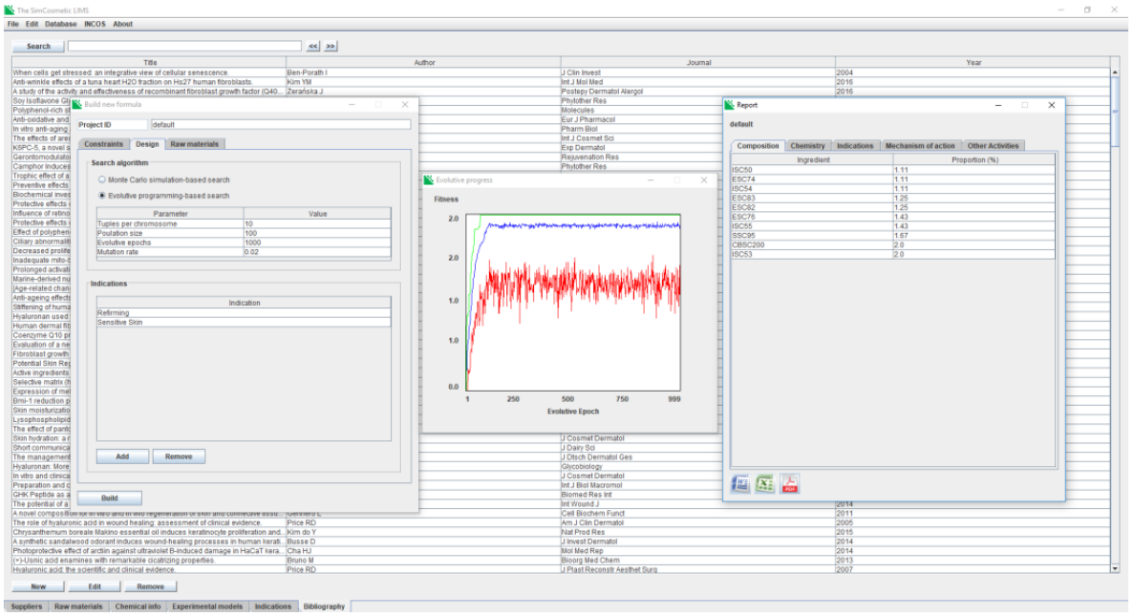


Figura 3.1.2. Algoritmo genético de INCOS: el cuadro de la izquierda representa los parámetros a seleccionar; el cuadro central representa el cálculo de cada iteración y el cuadro derecha representa el resultado final obtenido.

Esta herramienta ha sido el punto de partida en esta Tesis Doctoral, siendo el principal objetivo la reestructuración, rediseño y reconfiguración de la herramienta para su mejora y utilización, tanto interna como externa.

2. Diseño de base de datos

Una base de datos (BD o DB) es un conjunto de archivos ordenados donde se almacenan multitud de datos para un fin concreto. Actualmente y debido al alto volumen de datos que presenta y la rapidez de generar datos nuevos, las bases de datos comúnmente se estructuran en formato SQL (*Structure Query Language* o lenguaje de consulta estructurada). SQL es un lenguaje interactivo que permite la solicitud o petición de datos de manera dinámica e interactiva, mediante el uso de álgebra y cálculos racionales. Estas consultas se realizan con un lenguaje de comandos que permite seleccionar, insertar, actualizar y obtener datos mediante una petición o consulta. Es un lenguaje utilizado desde los años 70, que reconoce como el lenguaje internacional de las bases de datos, y su aprendizaje es el primer paso para el desarrollo de nuestro sistema informático.

El Sistema de Gestión de bases de datos (SBDG o DBMS, *DataBase Management System*) es un conjunto de programas que permiten almacenar, modificar y obtener información de la DB. Este sistema permite el diseño y creación de la DB que consistirá en organizar, manipular, acceso controlado, mantenimiento y actualización. El software más utilizado para visualizar la estructura de una DB es MySQL, en el lenguaje SQL de código abierto. Por otra parte, la herramienta utilizada para visualizar los datos dentro de su estructura es HeidiSQL, la cual permite interactuar con los datos. Ambas herramientas son compatibles con todos los sistemas operativos gratuitos y con facilidad de gestión y alto rendimiento. La estructura de conexión de la DB al usuario se representa en la figura 3.2.1., donde el sistema SDBG es la conexión entre la DB y el usuario.

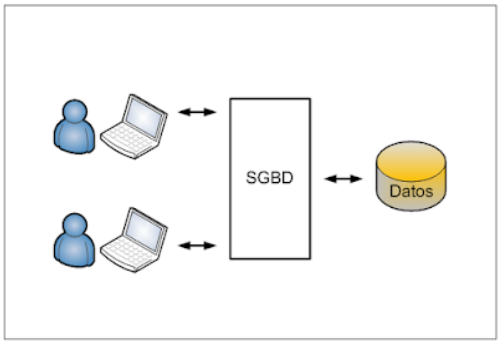


Figura 3.2.1. Organización de los datos. La gestión de entrada y salida de datos de la DB se realiza por el sistema SGDB, donde los usuarios interactúan a través de los ordenadores con SGDB.

Las bases de datos tienen una serie de reglas de restricción para mantener la integridad de los datos, estas claves o reglas permiten garantizar su fiabilidad y mantenimiento. Cada una de las peticiones SQL es una transacción de datos, una secuencia de operaciones lógicas conforme a ACID (Atómicas, Coherentes, Aisladas y Duraderas). La atomicidad permite que la transacción sea completada y ejecutada correctamente. La coherencia requiere que los datos escritos y las transacciones cumplan con las reglas establecidas. El aislamiento independiza los datos de las transacciones. La durabilidad implica que los cambios en la base de datos deben ser continuos en el tiempo y permanentes independientemente de las transacciones.

Las bases de datos pueden tener diferentes estructuras y una de las más comunes es la base de datos relacional RDB (*Relational Database*). Esta estructura contempla los datos en tablas, donde las columnas son atributos y las filas son listas ordenadas de objetos (tuplas), las cuales se relacionan entre sí mediante claves. Esto permite evitar duplicidad de datos, alto almacenamiento, gran organización y capacidad de relacionar datos entre tablas. En la figura 3.2.2. se observa un esquema de la estructura de una tabla en una RDB. Esta organización permite la búsqueda de datos concretos en una base de datos amplia, donde mediante un lenguaje SQL de consultas, se puede obtener el dato de la tabla, columna, fila y posición concreta. Resumiendo, una base de datos permite la entrada de gran cantidad de elementos, con una organización muy precisa para evitar errores y mejorar la rapidez en su búsqueda.

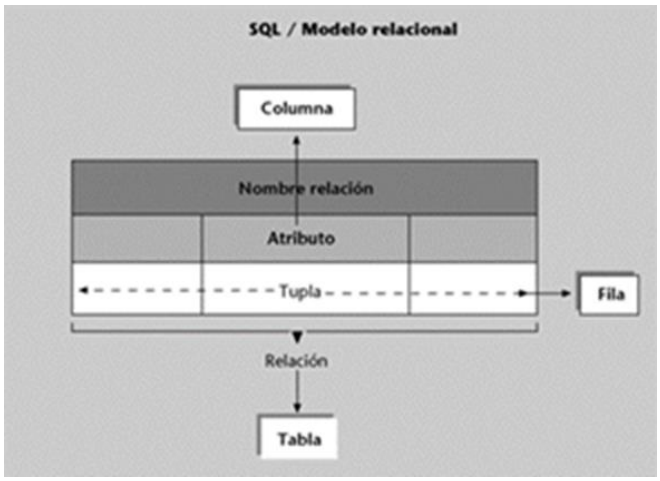


Figura 3.2.2. Estructura de tablas dentro de RDB. La tabla tiene unas columnas que son los atributos y cada fila es una tupla. A su vez, cada tupla se relaciona con otras tablas por un código.

En la base de datos se diseñaron dos grupos principales de tablas: aquellas que contenían información obtenida del laboratorio o información interna, y las tablas con información complementaria obtenida de DB externas o públicas. Dentro del conjunto de tablas de datos externos, la tabla principal que contiene la información de los ingredientes se denomina "raw materials", e incluye todo lo relativo a los ingredientes. En esta tabla se determina el nombre del ingrediente, descripción, nivel de uso, solubilidad, preservantes, tipo de ingrediente, tamaño y precio. La tabla principal dentro del conjunto de información interna se denomina "internal info". En esta tabla, se sitúa la información codificada de los ingredientes, número de lote y fecha. A partir de estas tablas se generará la estructura de la DB y, por lo tanto, cómo buscar la información interna.

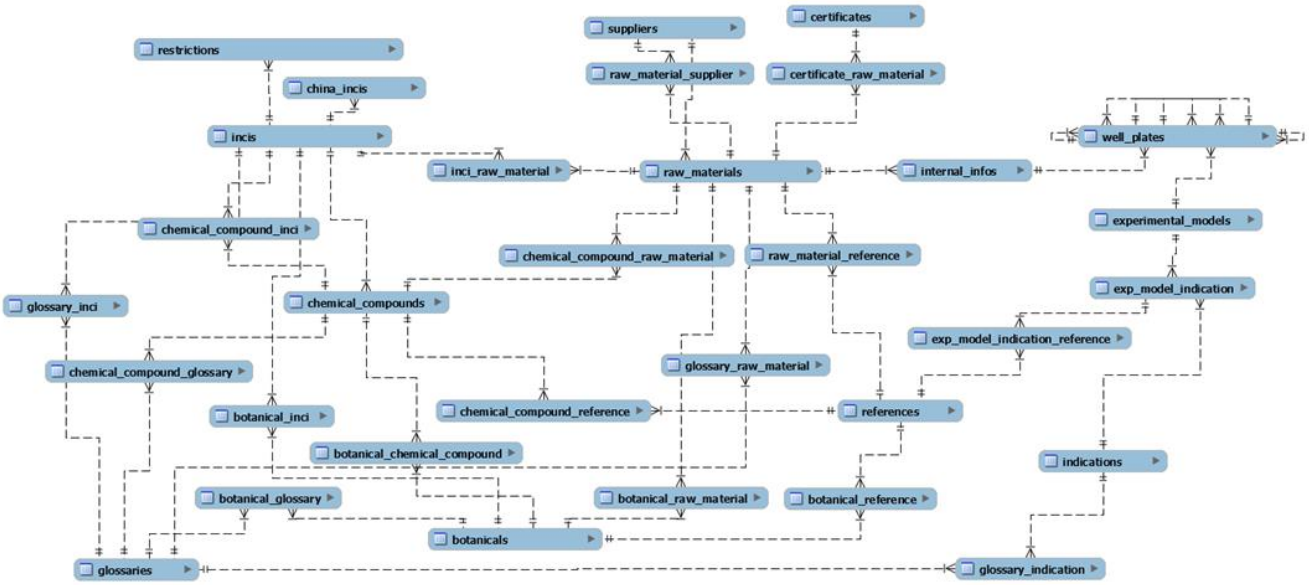


Figura 3.2.3. Tablas de la DB de INCOS, incluye las tablas principales y sus relaciones.

La tabla de "suppliers" o proveedores incluye las empresas que comercializan de cada ingrediente, estableciendo una relación de un ingrediente con uno o varios proveedores o un proveedor con varios ingredientes. Cada proveedor se definirá con los siguientes atributos: nombre, página web, teléfono, situación geográfica, país, certificados de empresa, etc. Por otro lado, los ingredientes pueden estar presentes en un certificado, para ello se definió la tabla "certificates" o certificados, cuyos atributos son: logo, nombre, web, email, descripción, organismo, país, requerimientos, restricciones y grado de certificación.

Desde el punto de vista de composición de cada ingrediente se definen dos tipos: compuesto químico (*chemical compounds*) y extracto botánico (*botanicals*), en dos tablas diseñadas específicamente. La tabla de "chemical compounds" o compuestos químicos, que contiene

la información de cada uno de los compuestos químicos presentes en los ingredientes, tanto en los extractos como en los compuestos puros. Esta tabla se definió mediante la base de datos pública PubChem, donde se incluyeron los siguientes atributos: nombre del compuesto, estructura molecular, SMILES (*Simplified Molecular-Input Line-Entry System*), nombres alternativos, nombre IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), InChi (*International Chemical Identifier*), InChiKey (*International Chemical Identifier Key*), número CAS (*Chemical Abstract Service*), número EC (*European Community*), peso molecular, propiedades físicas de color, olor, temperatura de ebullición y de sublimación, solubilidad, densidad, viscosidad, pH, etc. Respecto a la tabla "botanicals" o botánicos, los atributos seleccionados fueron: nombre, nombre común, el reino, familia y especie a la que pertenece, origen, usos etnobotánicos y farmacéuticos del extracto. Utilizando referencias bibliográficas se relacionaron los compuestos químicos principales contenidos en los extractos. Los compuestos químicos se relacionaron con los ingredientes. Las referencias bibliográficas se añadieron a la tabla de "references bibliography" o bibliografía, en la que se situó toda la información de principales publicaciones de la DB PubMed, y se relacionó con la información a la cual hacen referencia.

Cada ingrediente debe estar regulado y definido por la regulación europea. La base de datos oficial CosIng (*Cosmetic Ingredient database*) de la UE (Unión Europea) define cada ingrediente por la nomenclatura INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) que genera un nombre internacional a los ingredientes. Esta nomenclatura debe aparecer en los envases de los cosméticos situando los ingredientes de mayor a menor concentración. Por otro lado, cada ingrediente está definido por su composición, función y restricciones de uso. Además, las sustancias con restricciones se clasifican por el código CMR (Carcinogénico, Mutagénico y Reprotóxico) que determina la toxicidad del ingrediente. En nuestra base de datos, se incluyeron la tabla INCIs y la tabla restricciones, en las que se añadió la información regulatoria de cada ingrediente y las restricciones asociadas a cada uno, respectivamente. Posteriormente, se definió la tabla China INCIS donde se incluyó la nomenclatura China de los ingredientes, asociando a cada INCI con su correspondiente China INCI y las restricciones de uso en ese país, de tal manera que se pueden añadir las restricciones de los países asociados a la nomenclatura INCI internacional.

Finalmente, se diseñó la tabla “glossary” o glosario que contiene la definición de una serie de términos aplicados al tipo de ingrediente, por ejemplo, emulsionante, ingrediente activo, saponificante, preservante, fragancia, abrasivo, absorbente, colorante, etc.., es decir, se asoció la función del ingrediente, pudiendo definir el tipo de cosmético al cual se aplican los ingredientes. Además, esta tabla permite añadir definiciones que ayudan a buscar ingredientes en combinación y formulación de productos. Por otro lado, el atributo función descrito en la tabla INCI se asoció a esta tabla, permitiendo definir la función del ingrediente en los productos finales.

Estas tablas definen la información obtenida de bases de datos externas y sus relaciones. Posteriormente, se definieron las tablas con la información interna. Primero cada ingrediente se codificó por un código interno, incluido en la tabla “internal info” información interna, donde los atributos de la tabla son: código del ingrediente, número de lote, fecha de entrada. Por un lado, los ingredientes se analizaron en el laboratorio, donde los modelos experimentales se sitúan en la tabla “experimental models” o modelos experimentales, incluyendo una definición de cada uno de ellos. Por otro lado, la tabla “protocols” o protocolos define el proceso aplicado en cada modelo experimental, incluyendo las dosis, los controles y el procedimiento SOP (*Standard Operating Procedure*). Cada protocolo se asoció al modelo experimental correspondiente, incluyendo los cálculos que se aplican a los datos y las reglas de actividad que se obtienen en función de los cálculos realizados.

Cada multiplaca de 24 o 96 pocillos utilizada en el laboratorio se estructura en unas tablas que se definen por dos dígitos. El primer dígito hace referencia al tipo de medición, el segundo dígito se asocia a las operaciones matemáticas que se aplican en ese experimento. Por ejemplo, la media de los datos y cálculo del porcentaje se definen en estos dígitos (Tabla 3.2.1.). Con este procedimiento se introdujeron inicialmente los datos obtenidos de las placas multipocillos en tablas descritas por el nombre “well plate” o pozo de placa y los dígitos correspondientes (ejemplo well plate 0102), permitiendo calcular automáticamente los datos finales. Además, se asocia al ingrediente medido y sus dosis, y al modelo experimental con el protocolo específico que se ha aplicado.

Tabla 3.2.1. Tabla resumen de la introducción de datos de medidas de placa, son cuatro números, los dos primeros corresponden al tipo de medida y los dos siguientes al tipo de cálculo.

Tipo de medida	Tipo de cálculo
01: Measure1, Measure2, Measure3	01: Percent
02: Intensity, SD	02. Specific, Percent
03: Intesity1, Intensity2, Intensity3	03: Specific, Percent, Fold Induction
04: Measure1, Mueasure2	04: Specific, Percent, 100-Percent
05: RLU1, RLU2, RLU3	05: Percent especific WC
06: RLU, Protein	
07: RLU	
08: Absortion	
09: Measure	
10: Intensity	
11: RFU1, RFU2, RFU3	
12: Wound Confluence, Error WC	

El resumen de los datos medidos se introduce en la tabla llamada “well plates” o pozos de placas, donde se incluyen todas las tablas de dos dígitos descritas anteriormente. Por tanto, en esta tabla 3.2.1. se agrupa la información de todos los experimentos medidos, asociados al protocolo, modelo experimental e ingrediente, y estas tablas se visualizan en una tabla global denominada “well plates” o pozos de placa. Además, el protocolo se asocia a un criterio entre uno a tres positivos (+, ++, +++) en función del porcentaje o las veces de inducción obtenidas, calculado uno u otro en función del modelo experimental (tabla 3.2.2.). Esta puntuación es un resumen de la actividad experimental de cada ingrediente, incluida en la tabla resumen “well plates” o pozos de placa. El control primario, secundario, terciario y cuaternario vienen determinados por cada modelo experimental, en el protocolo se especifican los controles medidos en cada experimento. Estos controles permiten el cálculo automático de las reglas matemáticas.

Tabla 3.2.2. Reglas de actividad. Las siguientes tablas representan los cálculos de actividad en -, +, ++, +++ aplicados en función del porcentaje o veces de inducción, las dosis medidas y el tipo de experimento realizado.

Inducción	Caso 2 dosis	2 dosis < 50%	-
		1 dosis > 50%	+
		1 dosis > 50%, 1 dosis > 20%	++
		2 dosis > 50%	+++
	Caso 3 dosis	3 dosis < 50%	-
		1 dosis > 50%	+
		2 dosis > 50%	++
		3 dosis > 50%	+++

Inhibición	Caso 2 dosis	2 dosis > 50%	-
		1 dosis < 50%	+
		1 dosis < 50%, 1 dosis < 80%	++
		2 dosis < 50%	+++
	Caso 3 dosis	3 dosis > 50%	-
		1 dosis < 50%	+
		2 dosis < 50%	++
		3 dosis < 50%	+++

Veces de Inducción	Caso 2 dosis	2 dosis < 2	-
		1 dosis > 2	+
		2 dosis > 2, < 4	++
		2 dosis > 4	+++
	Caso 3 dosis	3 dosis < 2	-
		1 dosis > 2	+
		2 dosis > 2	++
		3 dosis > 2	+++

Inducción, calculando 50% y 80% (Caso melanina y tirosina)	Caso 2 dosis	2 dosis > 50%	-
		1 dosis < 50%	+
		1 dosis < 50%, 1 dosis < 80%	++
		2 dosis < 50%	+++
	Caso 3 dosis	3 dosis > 50%	-
		1 dosis < 50%	+
		2 dosis < 50%	++
		3 dosis < 50%	+++

50%: Table 0901: (Control - Kojic) / 2 = (Control primario – Control secundario) / 2

Inducción calculando 50% y 20% (Caso CB2 antagonista)	Caso 2 dosis	2 dosis < 50%	-
		1 dosis > 50%	+
		1 dosis > 50%, 1 dosis > 20%	++
		2 dosis > 50%	+++
	Caso 3 dosis	3 dosis < 50%	-
		1 dosis > 50%	+
		2 dosis > 50%	++
		3 dosis > 50%	+++

50%: Table 0602:(AM630 + SR144528) / 2 = (Control terciario + Control cuaternario) / 2

Inducción proliferación	Caso 2 dosis	2 dosis < 120%	-
		1 dosis > 120%	+
		2 dosis > 120%,	++
		1 dosis > 120%, 1 dosis > 200%	+++
	Caso 3 dosis	3 dosis < 120%	-
		1 dosis > 120%	+
		2 dosis > 120%	++
		3 dosis > 120%	+++

Inducción wound healing	Caso 2 dosis	2 dosis < control %	-
		1 dosis > control %	+
		2 dosis > control %	++
		1 dosis > control %, 1 dosis >50%	+++
	Caso 3 dosis	3 dosis < control %	-
		1 dosis > control %	+
		2 dosis > control %	++
		3 dosis > control %, 1 dosis > 50%	+++

Control %: valor del control primario.

Los modelos experimentales de SimDerma son rutas moleculares asociadas a diferentes aplicaciones cosméticas. La tabla "indications" o indicaciones especifica las potenciales indicaciones cosméticas de cada ingrediente. La asociación de cada indicación con cada modelo experimental se realizó mediante la tabla "bibliography references" o referencias, que permite una lectura detenida, permitiendo determinar por qué esa indicación se asocia con un modelo experimental determinado. De tal forma que se creó la tabla "bibliography references" o referencias bibliográficas que también incluye las referencias a los ingredientes, compuestos químicos, extractos botánicos, códigos INCI, glosario de términos, etc., es decir, son referencias aplicadas a cada tabla antes descrita, y asociándose a cada una de ellas. En la tabla 3.2.3. se observa esa asociación entre los modelos experimentales y las indicaciones.

Tabla 3.2.3. Relación entre los modelos experimentales y las indicaciones.

	Anti-Aging	Anti-Wrinkle	Anti-Cellulitis	Whitening	Moisturizer	Refirming	Hair Growth	SunCare	Sensitive Skin	Skin Repair
1. Cytotox. fibdbl asts/k eratinocytes*										
2. Proliferation in fibdbl asts	✔	✔								✔
3. Proliferation in keratinocytes	✔				✔					✔
4. MMP-9 in HaCaT	✔	✔				✔				✔
5. Real-time Wound Healing (fibdbl ast)		✔								✔
6. Real-time Wound Healing (keratinocy.)	✔				✔					✔
7. NF-κB signalling fibdb ./ keratinocytes	✔		✔		✔			✔	✔	
8. IL.6 in fibdbl asts							✔	✔	✔	
9. STAT3 activity							✔			
10. PPARγ activity		✔				✔				
11. PPARα activity	✔				✔					
12. Nrf2 activity	✔				✔			✔		✔
13. Total antioxidant activity	✔			✔	✔			✔		
14. Cellular antioxidant activity			✔	✔	✔					✔
15. PGE_2 in fibdbl asts				✔			✔	✔	✔	
16. Glucose uptake in keratinocytes	✔			✔	✔					
17. CB1 antagonistic activity							✔		✔	
18. CB2 agonistic activity	✔		✔							
19. TRPV-1 agonistic activity		✔				✔				
20. TRPV-1 antagonistic activity		✔						✔	✔	
21. Tyrosinase activity in melanocytes				✔				✔	✔	
22. Melanin synthesis in melanocytes				✔						
23. MMP-1 in HaCaT	✔	✔				✔				✔
24. Autophagy in keratinocytes	✔			✔						
25. HIF-1α in keratinocytes			✔		✔	✔				
26. HIF-1α in fibdbl asts			✔			✔				
27. COL1A2 gene induction (fibdbl asts)		✔				✔				✔
28. Fillagrin gene induction (keratinocy.)					✔			✔		
29. cAMP	✔	✔	✔		✔	✔	✔			✔
30.TIMP-1 in HaCaT	✔	✔				✔				✔

En las tablas se define la estructura de la base de datos, que permite incluir toda la información necesaria. Este proyecto se estructura en múltiples carpetas (figura 3.2.4), donde cada tabla se programa en la carpeta dentro de "*database*", "*migrations*". Cada tabla se describe en un archivo o fichero donde se especifica el nombre y cada uno de los atributos descritos anteriormente (figura 3.2.5).

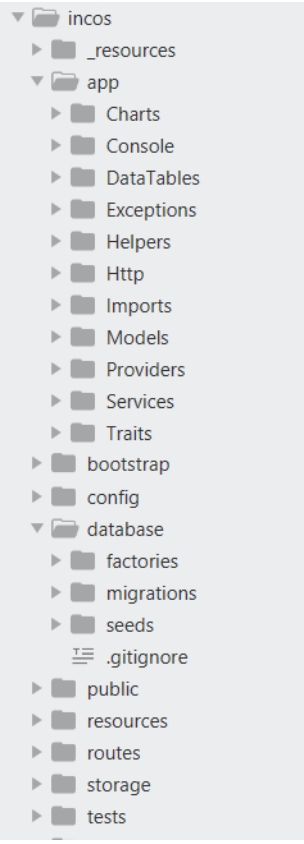


Figura 3.2.4. Estructura de carpetas del proyecto INCOS.

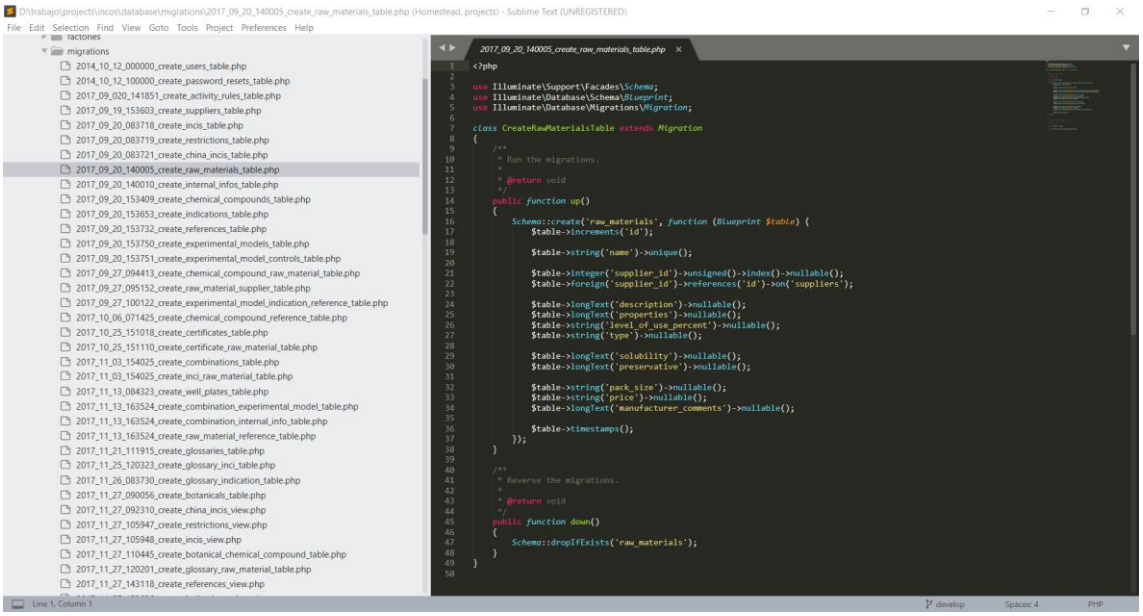


Figura 3.2.5. Archivo de ingredientes situado dentro de la carpeta base de datos, migraciones, especificando el nombre de la tabla y sus atributos.

Los datos se relacionan por tres tipos de reglas (figura 3.2.6), que se programan en la carpeta "*models*" del proyecto. La relación uno a uno, por ejemplo, un ingrediente se asocia a un código interno y no implica una tabla relacional intermedia porque se añaden los métodos "*has one*" y "*belongs to*" en los archivos "*models*" de las respectivas tablas. Por ejemplo, la relación uno a varios cuando un proveedor tiene muchos ingredientes requiere introducir una tabla intermedia la cual se denominó ingredientes vendedores, además de incluir los métodos "*has many*" y "*belongs to*" en los archivos "*models*" de las tablas correspondientes. Finalmente, en la relación varios a varios, por ejemplo, una indicación puede estar asociada a varios modelos experimentales y viceversa. En esta relación se generó una tabla intermedia donde se describe la relación, añadiendo el método "*belongs to many*" en ambos archivos "*models*" de las tablas correspondientes. Las tablas intermedias también se sitúan en la carpeta denominada "*migrations*", nombradas según las tablas relacionadas, por orden alfabético.

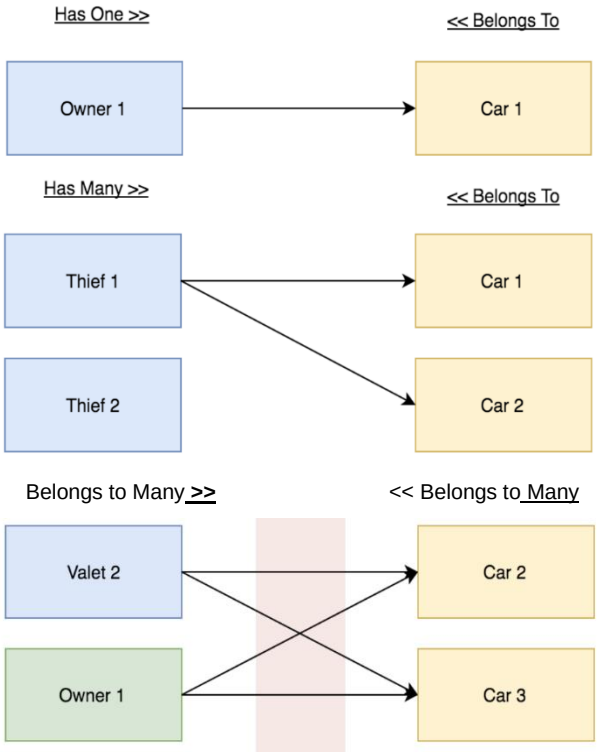


Figura 3.2.6. Tipos de reglas de relación.

En la figura 3.2.7. se puede observar las tablas relacionales junto con las tablas de datos, las cuales están desplegadas. En la figura 3.2.8. se puede observar el archivo "models" de "raw materials" o ingredientes donde se describen sus relaciones.

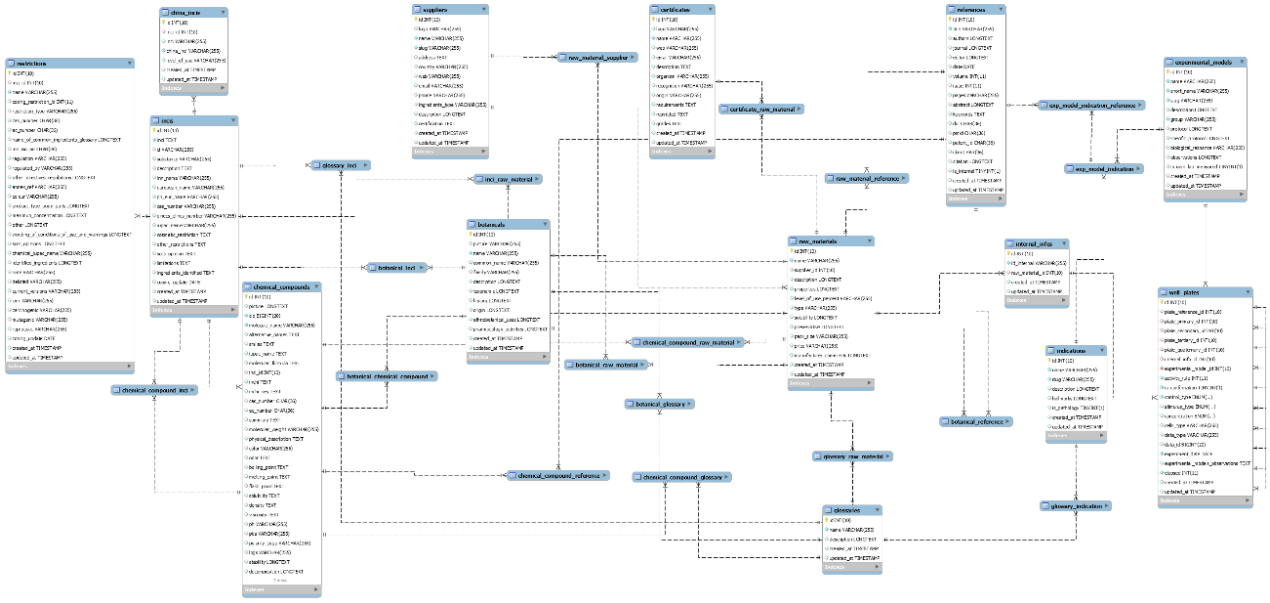


Figura 3.2.7. Resumen de las tablas de la DB, donde se observan desplegadas las tablas principales y cerradas las tablas relacionales entre ellas, las líneas punteadas unen las tablas.

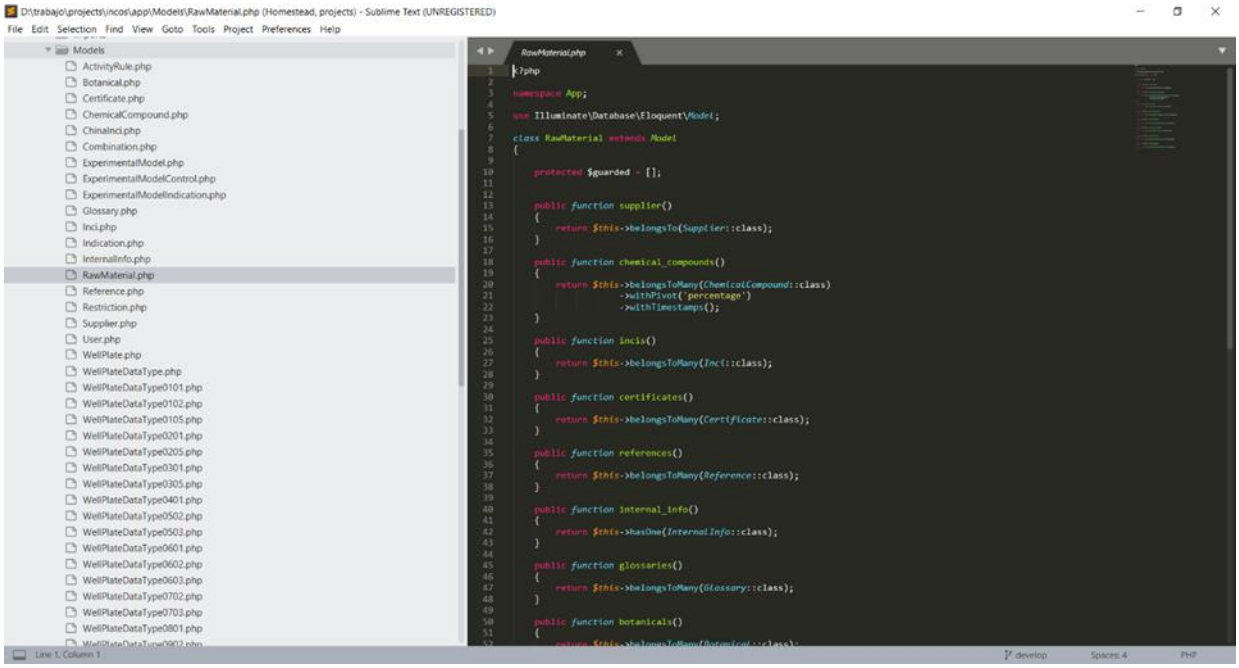


Figura 3.2.8. Carpeta “models” donde se especifican las relaciones, ejemplo tabla “raw materials” o ingredientes.

3. Introducción de datos en la generación de una base de datos

El patrón de estructura de un software se realiza separando los datos de la lógica. Para ello, el proyecto se divide en modelo, vista y controlador (figura 3.3.1.). El modelo son las tablas, la vista es el diseño final que utilizará el usuario, y el controlador conecta ambas partes. Este patrón de arquitectura permite el mantenimiento y actualización de los datos de una manera más rápida y eficiente. El modelo se ha descrito en el apartado anterior, en este punto será validado y en los puntos siguientes se describirán la vista y el controlador.

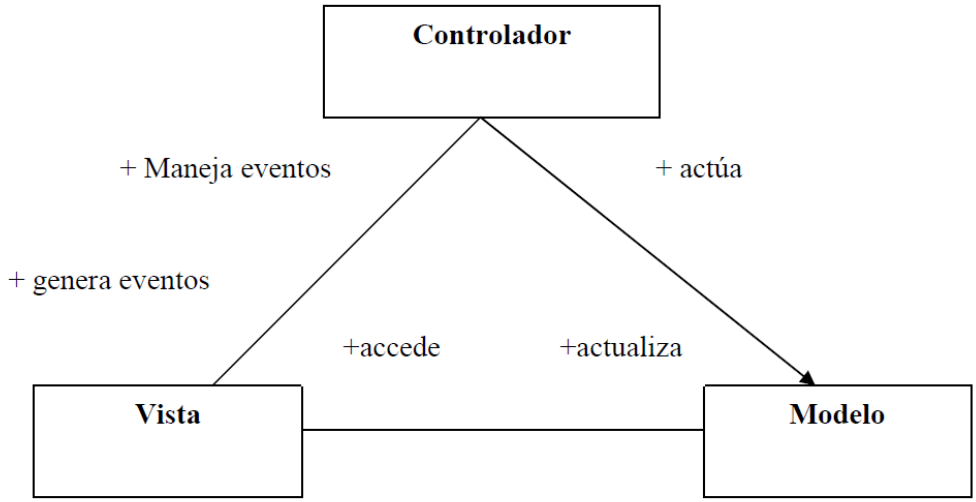


Figura 3.3.1. Estructura de un software, modelo, vista y controlador, donde el modelo son las tablas, la vista la interacción con el usuario y el controlador lo que les conecta.

Para realizar una validación de la estructura diseñada, se añadieron datos aleatorios, tanto en las tablas como en sus relaciones, comprobando la introducción y exportación de datos de una manera rápida y sencilla. Este proceso se realizó en la carpeta “database”, “factories”. En cada archivo se incluyeron los atributos de la tabla, añadiendo un método de generación de datos aleatorios en formato palabra, dígito o texto (figura 3.3.2. Ejemplo “raw material factory” o ingredientes aleatorios).

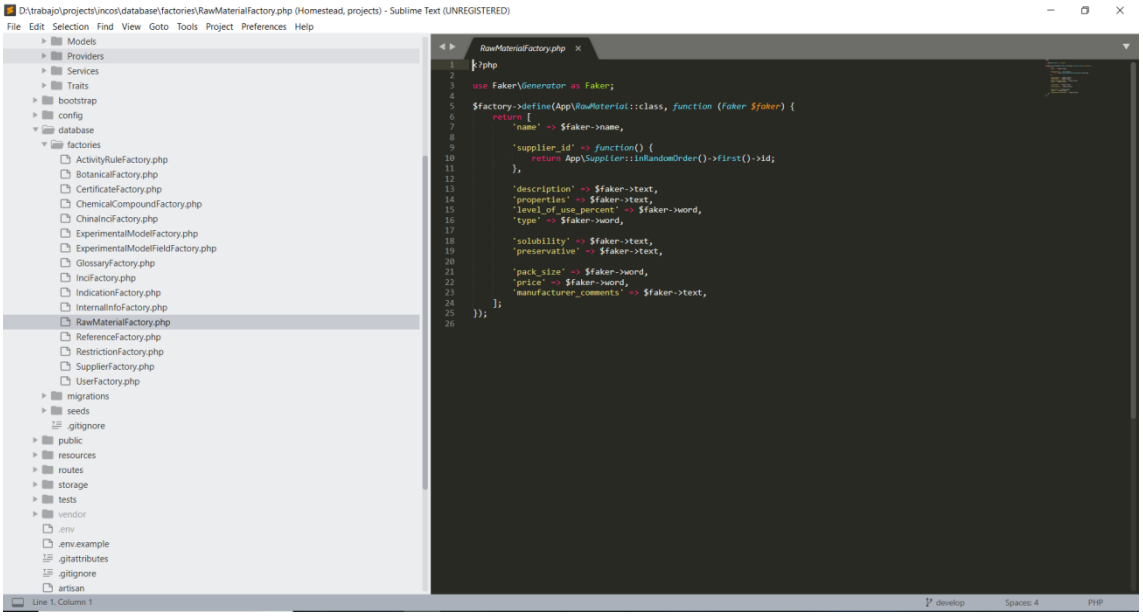


Figura 3.3.2. Archivo "Raw materials factory" del proyecto, donde se especifican los datos aleatorios para validar la tabla ingredientes.

Para validar la estructura y los datos, se diseñaron diferentes pruebas o "test" (figura 3.3.3.). Se generaron varios archivos donde se incluyeron diferentes métodos que comprueban cada columna introducida, observando que no se tiene ningún dato duplicado, nulo o erróneo y una estructura sólida que introduce todos los datos correctamente. Finalmente, se realizaron peticiones o consultas para comprobar la rapidez y determinar que los datos de la petición son los solicitados.

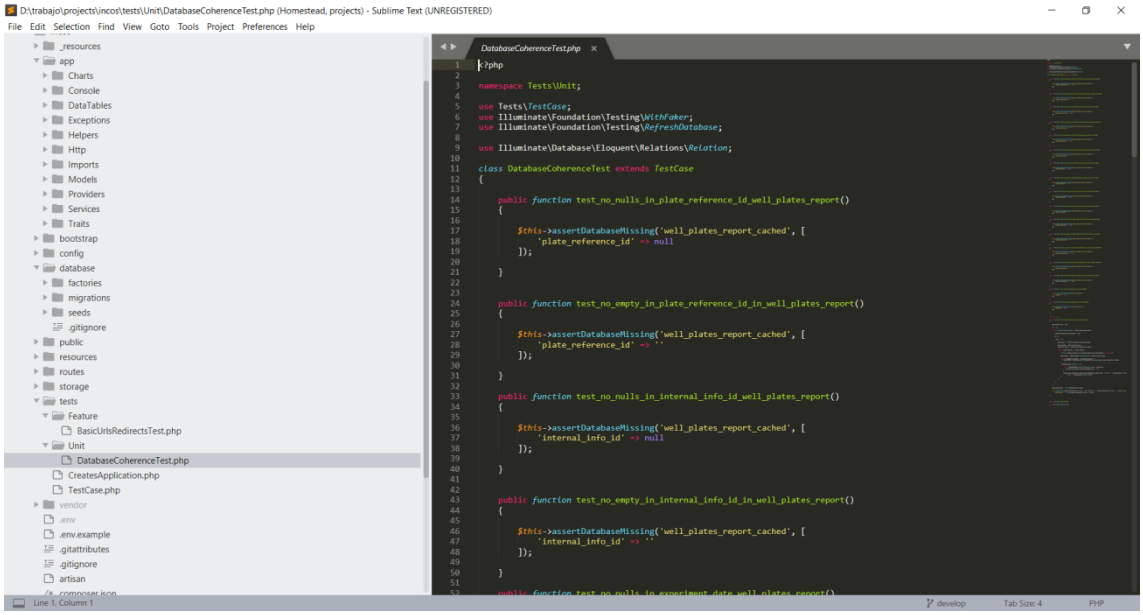


Figura 3.3.3. Carpeta "test" o pruebas del proyecto donde se diseñaron una lista de pruebas para la comprobación de la estructura de los datos y de los posibles fallos en la introducción de estos.

Una vez comprobada la estructura de la base de datos y mediante programación se introdujeron los datos verdaderos y definitivos en nuestra herramienta informática. Esta primera parte se realizó así debido a los posibles errores o cambios significativos que pudieran derivarse. Para este paso, los datos se situaron en la carpeta de proyecto "seeder", donde se introdujo un archivo "seed" de cada tabla (figura 3.3.4.). Los datos programados en estos archivos son reintroducidos en la DB a cada cambio aplicado, para evitar errores y pérdida de información. En este punto, la herramienta se consideró en prueba, donde se revisaron los datos, aplicando las pruebas que confirman su validación.

Este paso fue fundamental para comprobar y validar el apartado anterior. Además, se determinaron los cálculos matemáticos necesarios para obtener los valores finales a partir de los datos introducidos. Para ello, se añadieron las columnas que permiten su cálculo automático, como la media, el porcentaje o las veces de inducción. Estos cálculos se validaron, comprobando los cálculos con datos de referencia.

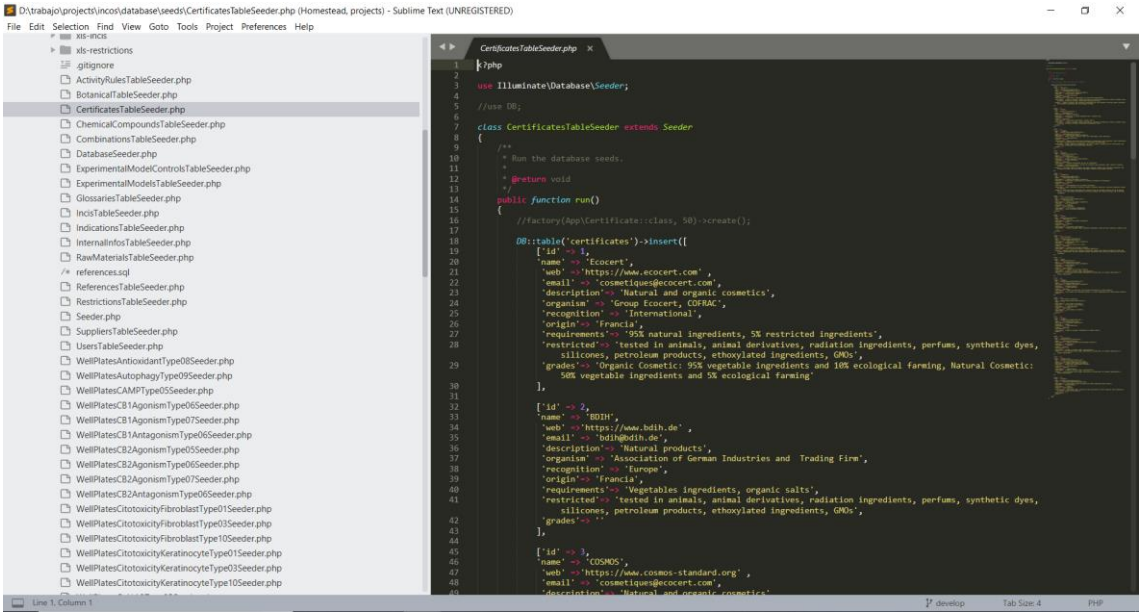


Figura 3.3.4. Carpeta “seeders” del proyecto, donde se introdujeron los datos reales, ejemplo tabla “certificates seeder”.

En la tabla de ingredientes se introdujeron 600 ingredientes medidos hasta la fecha, junto con la información de cada uno de ellos. A partir de esto, se añadieron los datos de sus tablas relacionadas. En la tabla vendedores se añadieron 40 proveedores de los ingredientes y en la tabla certificados se incluyeron 15 certificados asociados a cada ingrediente.

Cada ingrediente tiene un INCI asociado, descrito en la DB oficial CosIng (figura 3.3.5). Para ello, mediante un Excel descargado de la web oficial se añadió la información de los INCIs y restricciones de cada ingrediente. Primero se añadieron todos los datos de la DB pública, unos 25 mil INCIs, los cuales se relacionaron con nuestros 600 ingredientes de manera manual. Además, se descargaron y añadieron los anexos donde se sitúan las restricciones de cada INCI, y después se establecieron sus relaciones (figura 3.3.6). Por otro lado, la base de datos CosIng contiene una lista de funciones de cada ingrediente, que se introdujo en la tabla glosario, con su nombre y descripción concreta, estableciendo las relaciones con los INCIS.

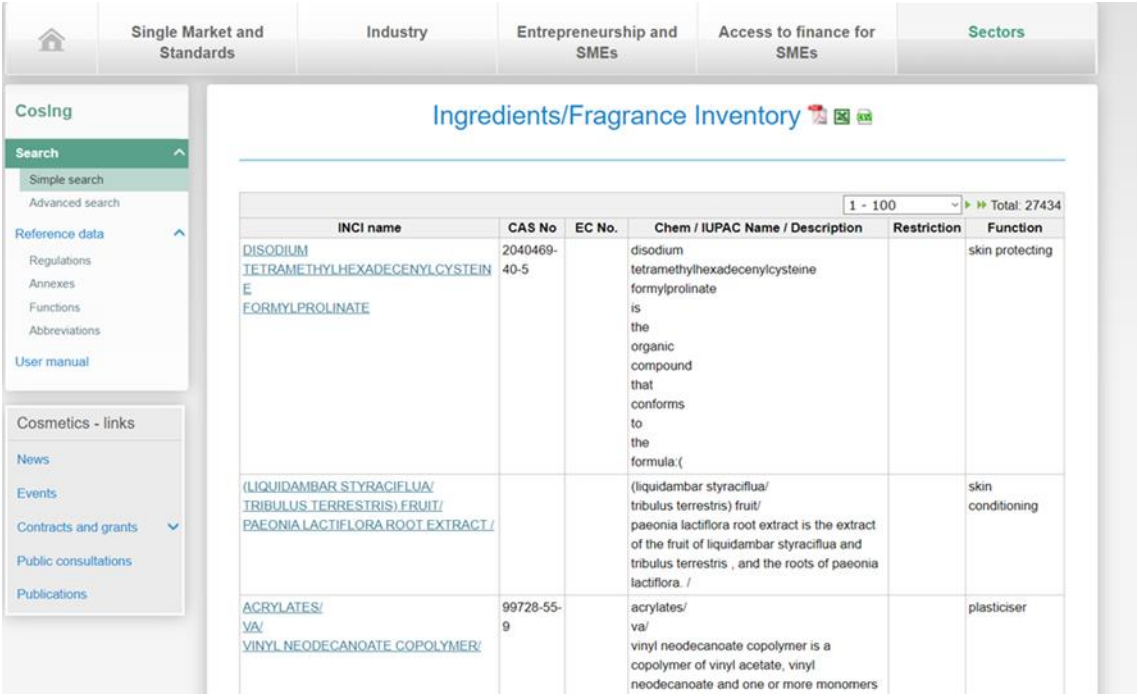


Figura 3.3.5. DB CosIng, base de datos oficial de la U E, de donde se obtienen los datos de regulación de cada ingrediente, INCI.

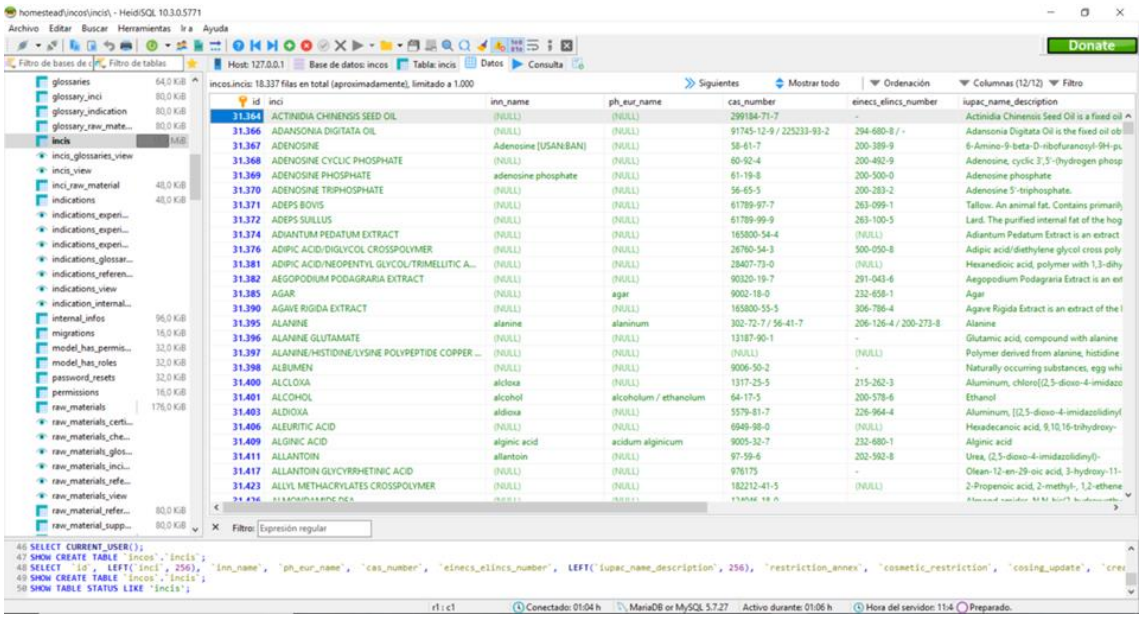


Figura 3.3.6. Programa HeidiSQL, donde se observan los datos introducidos, ejemplo tabla INCIS.

Los ingredientes se clasificaron según su naturaleza en dos tipos: aproximadamente, la mitad de los ingredientes son compuestos químicos y la otra mitad son extractos botánicos. La información de los compuestos químicos se obtuvo de la página web oficial PubChem (figura 3.3.7). Se introdujeron todos los compuestos químicos presentes en los ingredientes, estableciendo el porcentaje de pureza del producto, en caso de tener ese dato.

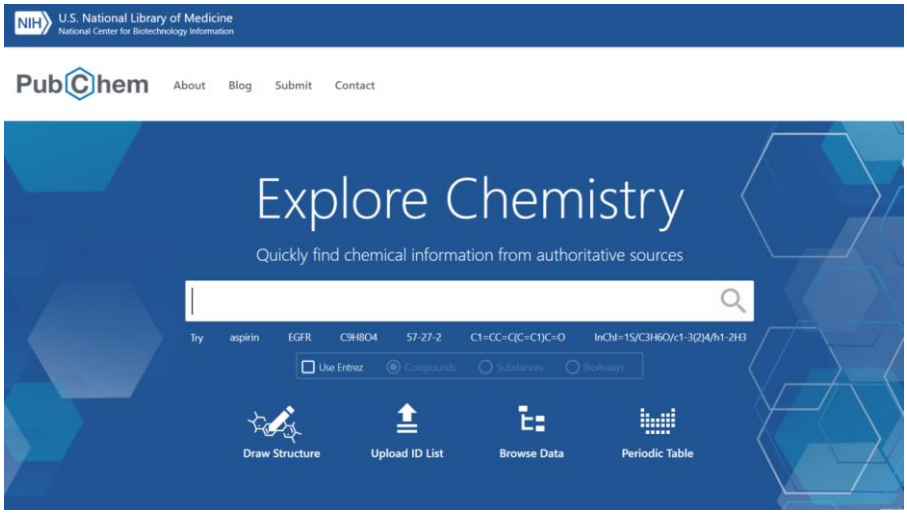


Figura 3.3.7. Base de datos pública PubChem de compuestos químicos.

Los extractos se clasificaron por el nombre botánico de la planta de origen, y se añadieron en la tabla “botanicals” o botánicos, incluyendo su clasificación en el reino vegetal (figura 3.3.8). Para definir cada extracto, se buscaron los compuestos químicos mayoritarios mediante referencias bibliográficas. Con dicho fin, se introdujeron los compuestos químicos presentes en los extractos, además de la relación bibliográfica de donde se ha obtenido la información en cada caso.

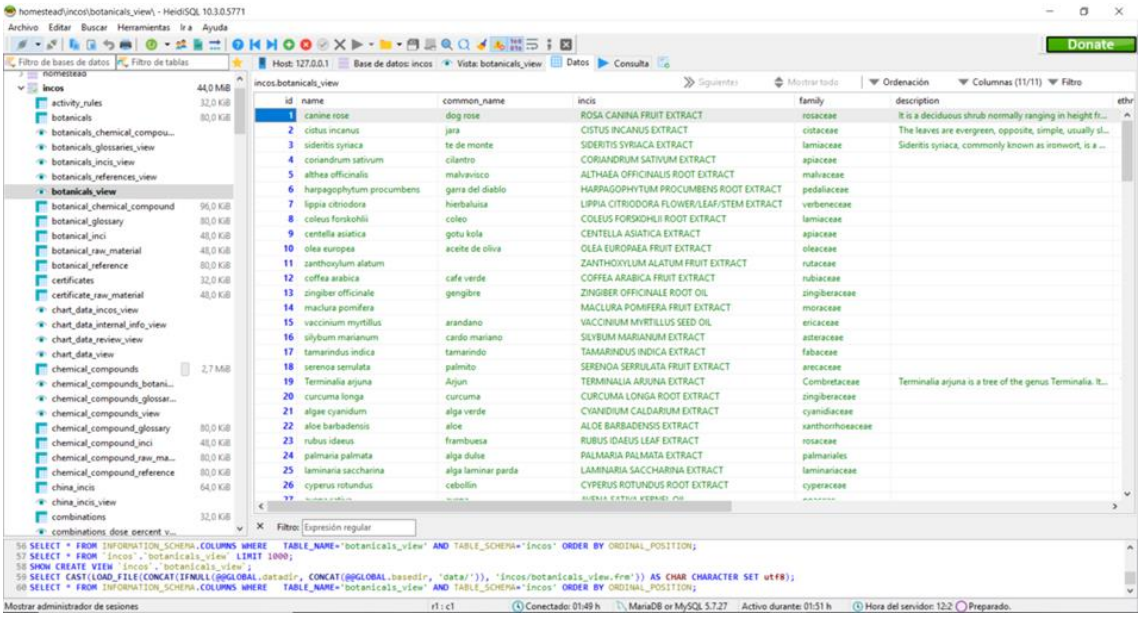


Figura 3.3.8. Programa HeidiSQL, datos introducidos en la tabla extractos botánicos.

Además, cada ingrediente se codificó mediante un código interno situado en la tabla “internal info” o información interna, incluyendo el número de lote y fecha de entrada. En la tabla modelos experimentales se añadieron 30 modelos experimentales medidos desde

el año 2014, permitiendo realizar una trazabilidad (figura 3.3.9). Además, esta tabla se conecta con la tabla “indications” o indicaciones, donde se añadieron 12 indicaciones de la piel. Estas dos tablas se conectaron mediante las referencias bibliográficas añadidas en la tabla “bibliography references” o referencias bibliográficas.

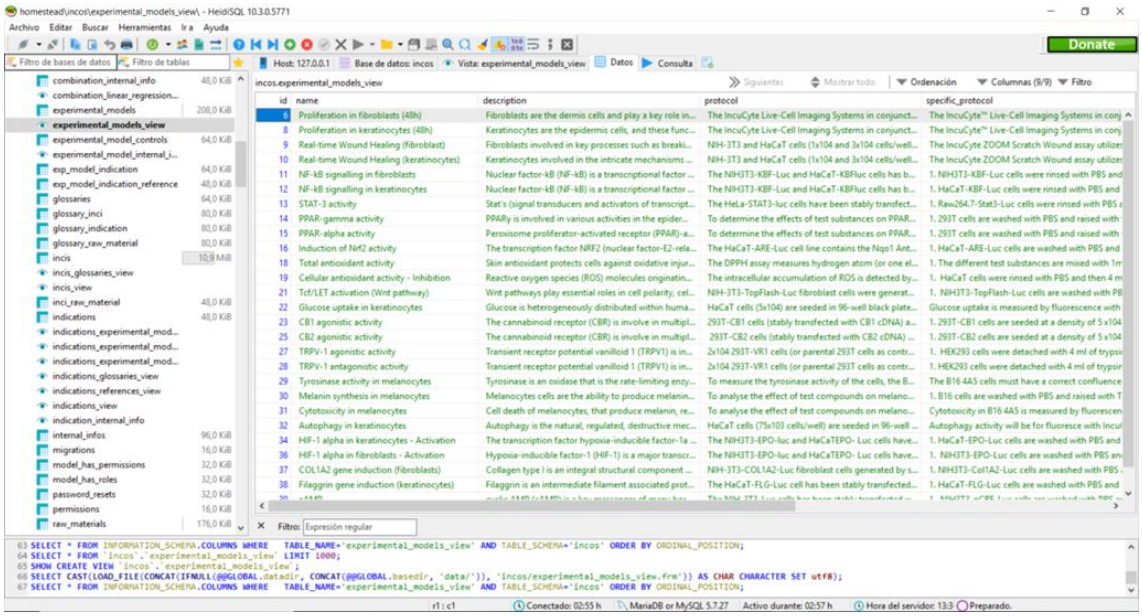


Figura 3.3.9. Programa HeidiSQL, ejemplo datos introducidos en la tabla “experimental models”.

Hasta el momento, los resultados medidos en el laboratorio se almacenaron en un archivo Excel que relacionaba cada placa con una cuadrícula del archivo. Para la introducción de estos datos se diseñó una programación donde cada tabla es copiada y pegada en el archivo semilla correspondiente a cada modelo experimental. Este archivo generaba una matriz de datos para cada placa, donde se insertaba la fecha, experimento realizado, tipo de células utilizadas y tiempo en realizar el experimento. Cada fila de la matriz correspondía a un ingrediente, su dosis y las medidas realizadas. Los datos se introdujeron en tablas definidas por los dos números, descritos anteriormente. De esta manera al introducir los valores, se calculaban automáticamente las reglas matemáticas requeridas. Por otro lado, se establecía la relación con las tablas de modelos experimentales, ingredientes y protocolos aplicados. En la figura 3.3.10. se observa el archivo del modelo experimental antioxidante, donde cada matriz es una placa medida y a la izquierda se observan los archivos con los datos del laboratorio.

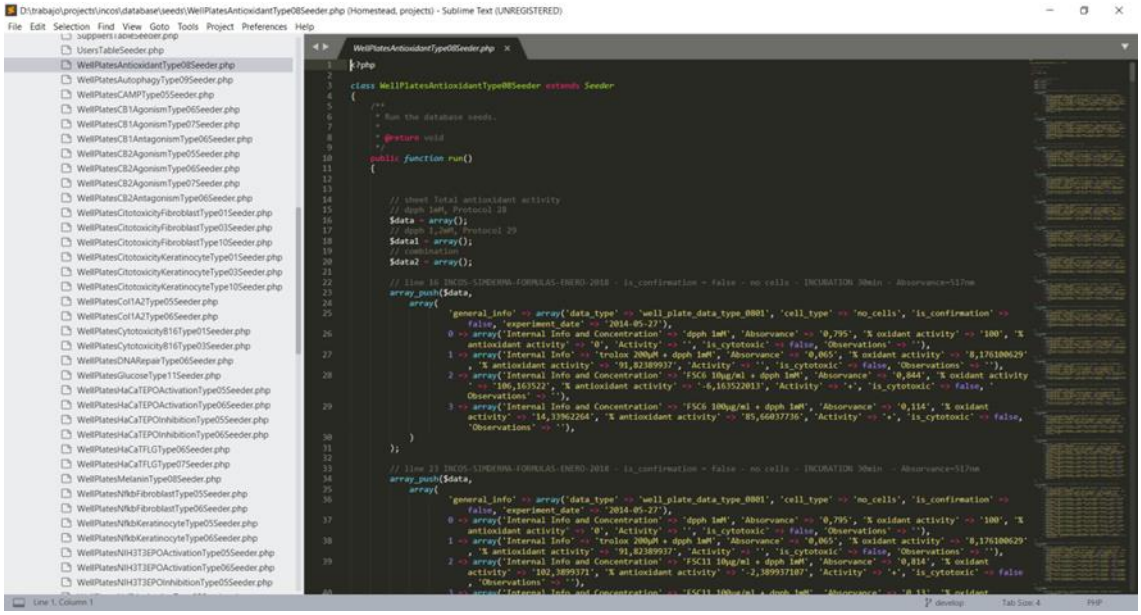


Figura 3.3.10. Carpeta semilla, ejemplo de datos de modelo experimental antioxidante.

Una vez introducidos los datos del laboratorio, unas 40 mil mediciones actualmente, se diseñó la tabla resumen “well plates” o pozos de placas, la cual contiene todas las medidas realizadas, permitiendo validar cada dato, comprobar los cálculos y las relaciones establecidas (figura 3.3.11).

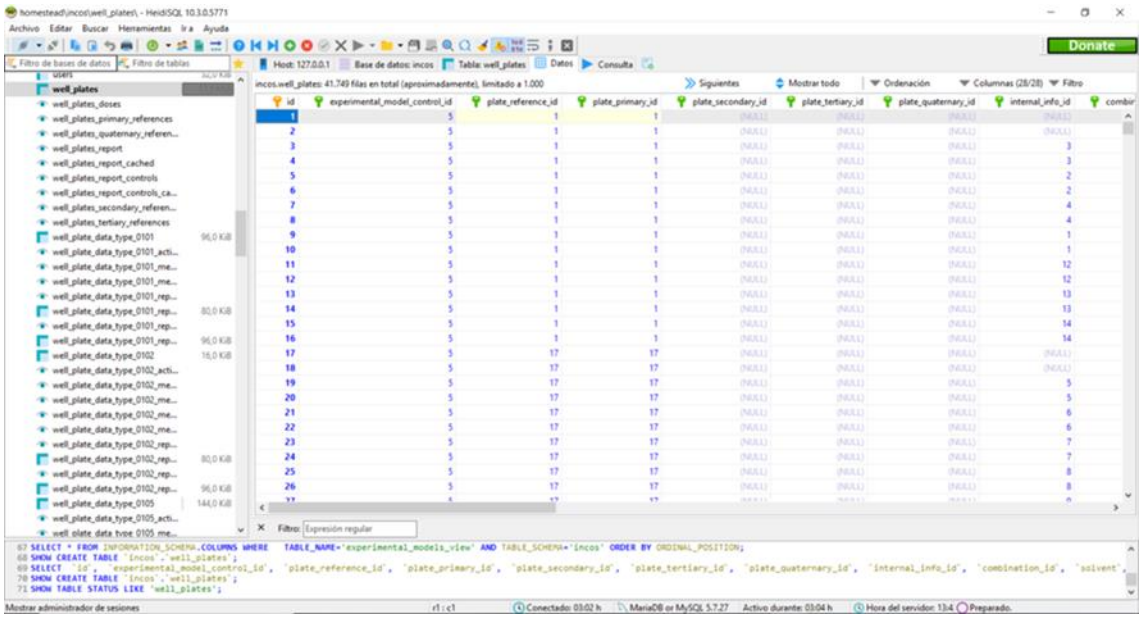


Figura 3.3.11. Herramienta HeidiSQL, tabla resumen “well plates” con todas las placas medidas en el laboratorio.

Una vez finalizado el proceso, cada dato introducido se debió validar y comprobar, ya que una vez publicada la herramienta para más usuarios no se pueden corregir errores. Para

ello, las pruebas diseñadas anteriormente permiten facilitar este procedimiento. En la figura 3.3.12 se observa una vista de la DB completa.

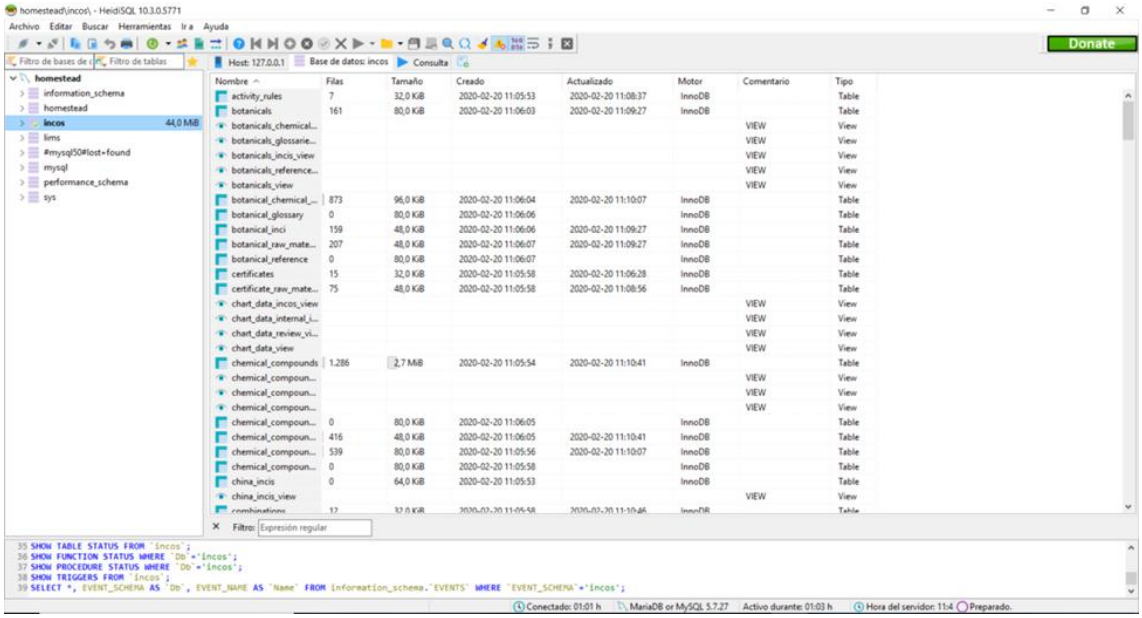


Figura 3.3.12. Programa HeidiSQL, resumen de las tablas de la Base de datos completa.

Para facilitar el proceso de introducción de datos por un usuario externo, de manera automática, se añadieron las conexiones con las bases de datos públicas, que permiten la entrada de datos externos. Las tablas para las cuales se realizó este proceso fueron: INCIs, restricciones, compuestos químicos y referencias. La tabla INCIs y restricciones se actualizan automáticamente mediante el Excel que proporciona la DB pública CosIng, para ello en la carpeta del proyecto, “importación” (*imports*) se estableció la relación entre la tabla Excel y los atributos establecidos en la DB (figura 3.3.13).

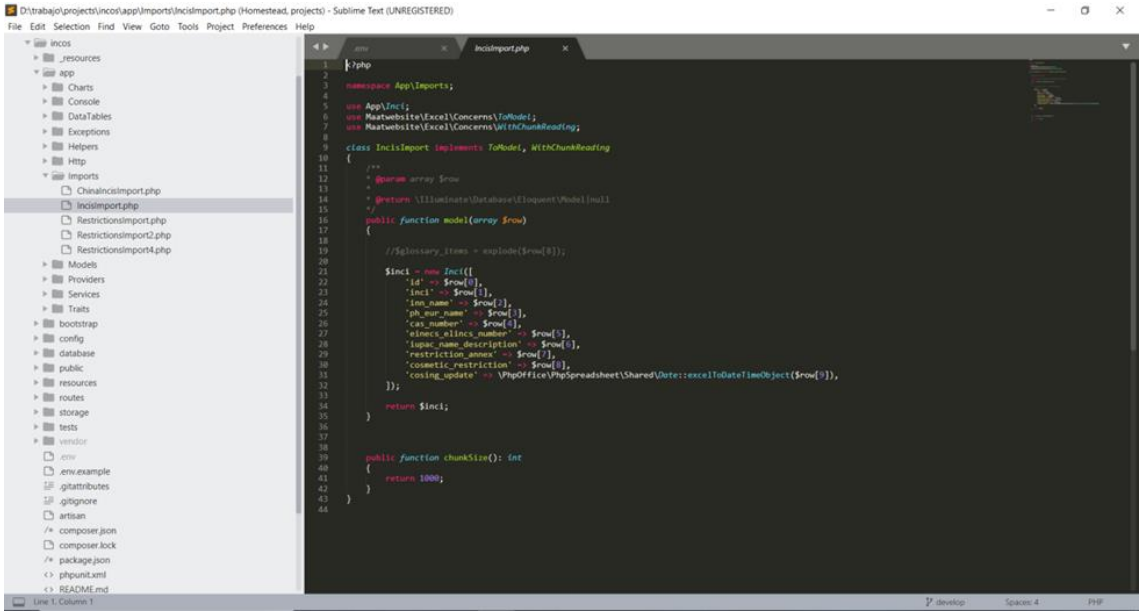


Figura 3.3.13. Carpeta “imports”, relación de los datos de los Excel con la tabla de datos en la DB.

Por otro lado, en el caso de las referencias se diseñó la posibilidad de añadir un código *pmid* (PubMed ID) correspondiente, donde se rellenarán los campos automáticamente de la página web PubMed, en la tabla de datos. En el caso de los compuestos químicos, se realizó el mismo proceso, donde introduciendo el CID o Chemical ID se rellenan los campos de forma automática a la tabla. Estas herramientas facilitan el proceso en la introducción de datos sin programación, donde un usuario externo pueda introducir datos de manera sencilla y eficaz. Estos procesos se realizaron conectando el lenguaje de programación JSON (*JavaScript Object Notation*, notación de objetos en java script) en formato de texto sencillo. Esta posibilidad está permitida por ciertas DB públicas, en este caso PubMed y PubChem, donde se puede intercambiar información con la DB.

4. Diseño visual de las tablas.

Una vez diseñado y validado el modelo de datos, se procedió a desarrollar la visualización de las tablas y se conectó mediante el controlador. Esta vista es una primera versión de la herramienta interna donde se pueden visualizar todos los datos, apto para cualquier usuario, hasta el momento los datos se han tratado mediante el programa HeidiSQL (figura 3.4.1).

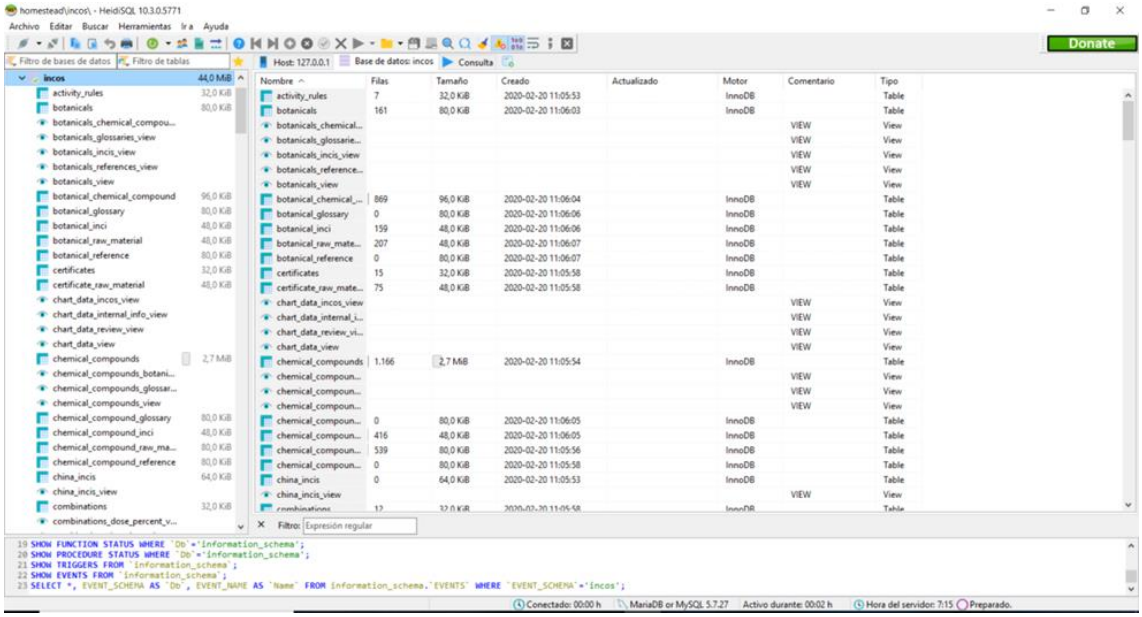


Figura 3.4.1. Programa HeidiSQL con todas las carpetas de la base de datos.

En nuestra estructura de software, se han separado los datos en tres tipos de archivos, según el formato modelo, vista y controlador (MVC). En el proyecto, la vista se diseña en las carpetas “app” y “views”, y el controlador en la carpeta “controllers”. Dentro de la carpeta “app”, se generaron los archivos “datatables” o tablas de datos con los atributos de cada tabla que se visualizarán finalmente en la web. Por otro lado, en la carpeta “controllers”, se situaron los archivos con los controladores de cada tabla donde se definen los métodos editar, modificar y eliminar. Finalmente, el diseño de las tablas se programó en la carpeta recursos, vistas. En resumen, se ha generado un controlador, tabla y vista por cada tabla que se quiera observar en la aplicación.

Los archivos “datatable” o tabla de datos contienen un resumen de los datos más relevantes a visualizar en cada tabla principal (figura 3.4.2). Debido a que algunas tablas contienen muchos atributos, se realizó una clasificación de los datos más relevantes para observar a primera vista. Para visualizar el resto de información asociada a cada valor se insertó el botón editar a través del cual se pueden visualizar todos los atributos.

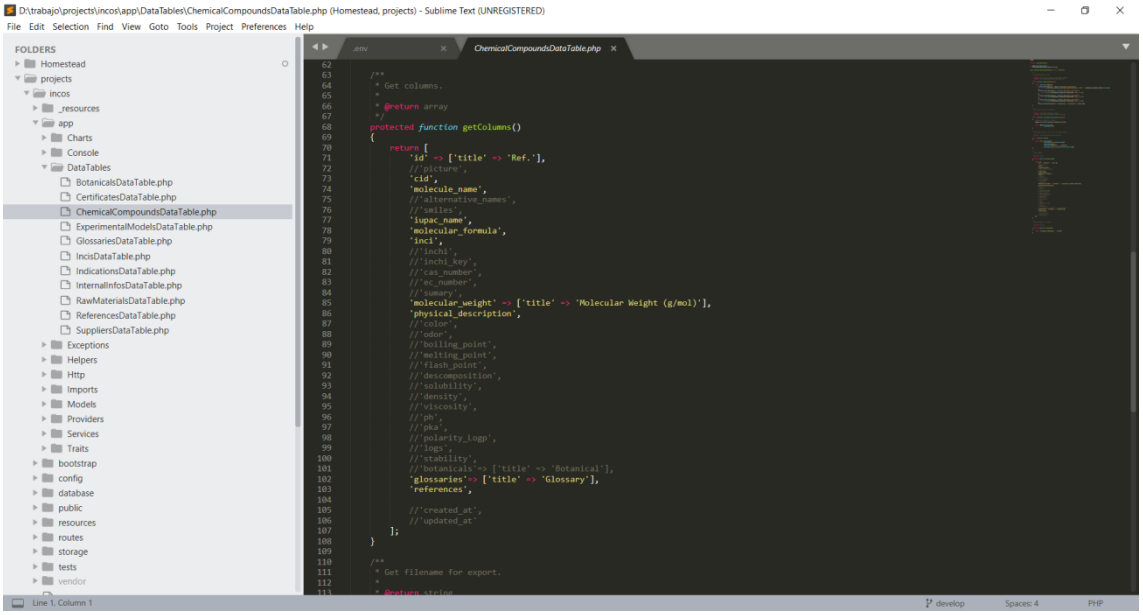


Figura 3.4.2. Archivo tabla de datos de compuestos químicos con los datos relevantes para visualizar en la tabla principal, solo se visualizan los datos resaltados en amarillo.

Los controladores permiten crear, editar, modificar o eliminar los datos. Para realizar este proceso visualmente, se situaron unos botones para cada acción. Estos botones no serán visualizados por todos los usuarios, ya que cada usuario presenta unos permisos de acceso y, por lo tanto, no todos los usuarios podrán borrar datos o modificarlos, evitando así la pérdida de información. Por ello, se diseñaron una serie de autorizaciones, permitiendo establecer unas preferencias por usuario.

En el archivo controlador se describen los siguientes métodos: “index” genera la tabla inicial con los atributos más relevantes, “create” permite crea nuevos datos, “show” permite observar el conjunto de datos, “edit” ayuda a editar todos los atributos, y “destroy” permite destruir los datos. En la figura 3.4.3 se puede observar el archivo del controlador de la tabla compuestos químicos.

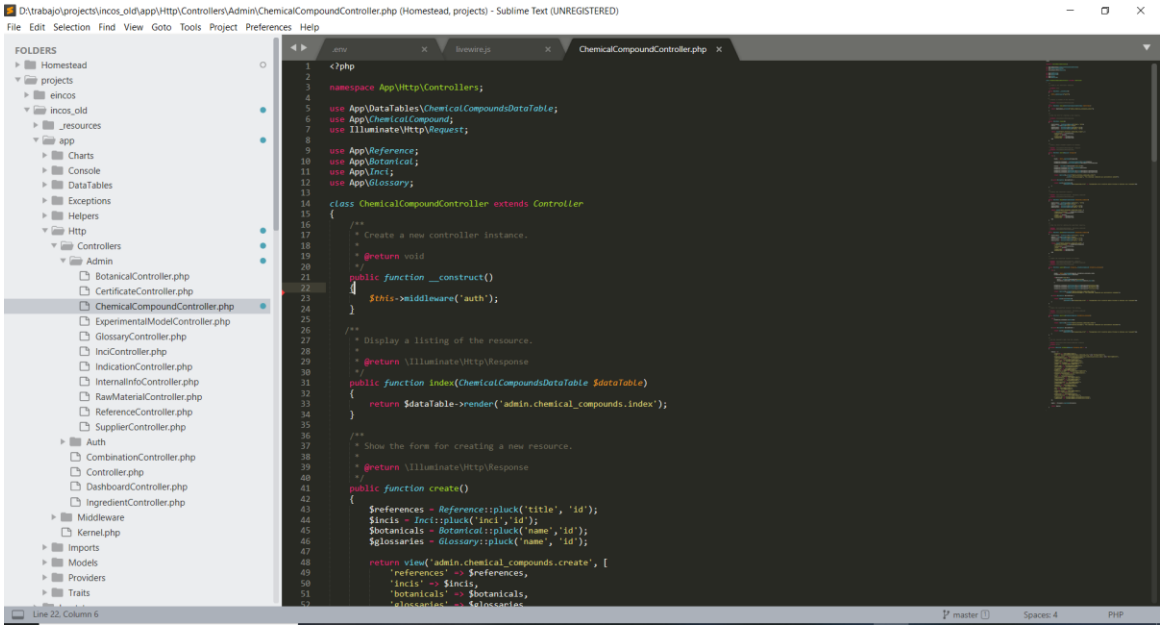


Figura 3.4.3. Archivo controlador, ejemplo compuestos químicos.

Para realizar la visualización de las tablas, primero se insertó la herramienta Bootstrap en el proyecto mediante JS (Java Script). Bootstrap es una biblioteca o conjunto de herramientas utilizado para el desarrollo web (figura 3.4.4). Esta herramienta contiene tablas, botones, menús y diferentes elementos para el diseño de una página web. Se basa en lenguaje HTML (*Hiper Text Markup Language*), CSS (*Cascading Style Sheets*) y JS. HTML es el lenguaje utilizado en las páginas web, permite la visualización de los datos. CSS u hojas de estilo en cascada, es un lenguaje utilizado para el diseño gráfico, permite establecer un diseño visual en lenguaje HTML. JS es un lenguaje de programación interpretado que permite la actividad rápida de la página web. Estos lenguajes permiten realizar cambios en nuestra web basándonos en la plantilla insertada en nuestro proyecto. Por lo tanto, esta herramienta permite añadir una plantilla de una tabla, añadir los botones, cuadrado de búsqueda y todos los puntos necesarios, ya prediseñados.

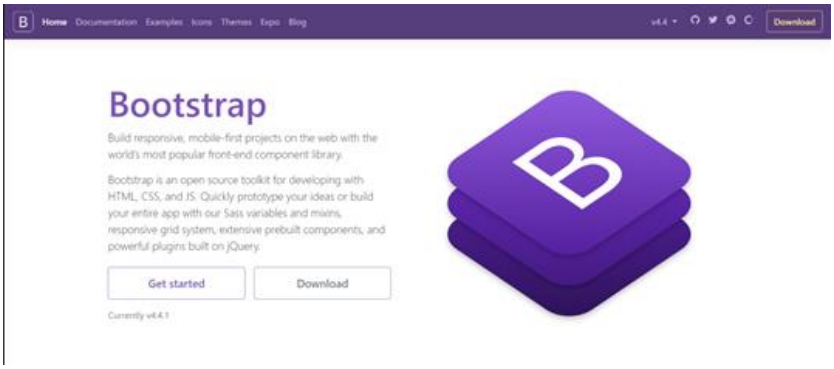


Figura 3.4.4. Bootstrap, herramienta para diseño y estructura web.

En la carpeta “resources”, “views”, “admin” se inserta una carpeta por tabla, donde se añaden los siguientes archivos: “index”, permite visualizar la tabla inicial, “button-actions”, se diseñan la lista de botones, “show” que permite mostrar los datos, “create” que edita un formulario en blanco para crear un dato nuevo, “edit” que edita un formulario relleno con los datos, y “form”, archivo donde se diseña el formulario para visualizar los datos. Esta carpeta de archivos se diseñó para cada tabla en nuestra web (figura 3.4.5). En el caso de las tablas relacionales, se diseñaron formularios adjuntos al principal que permiten la selección de datos relacionados.

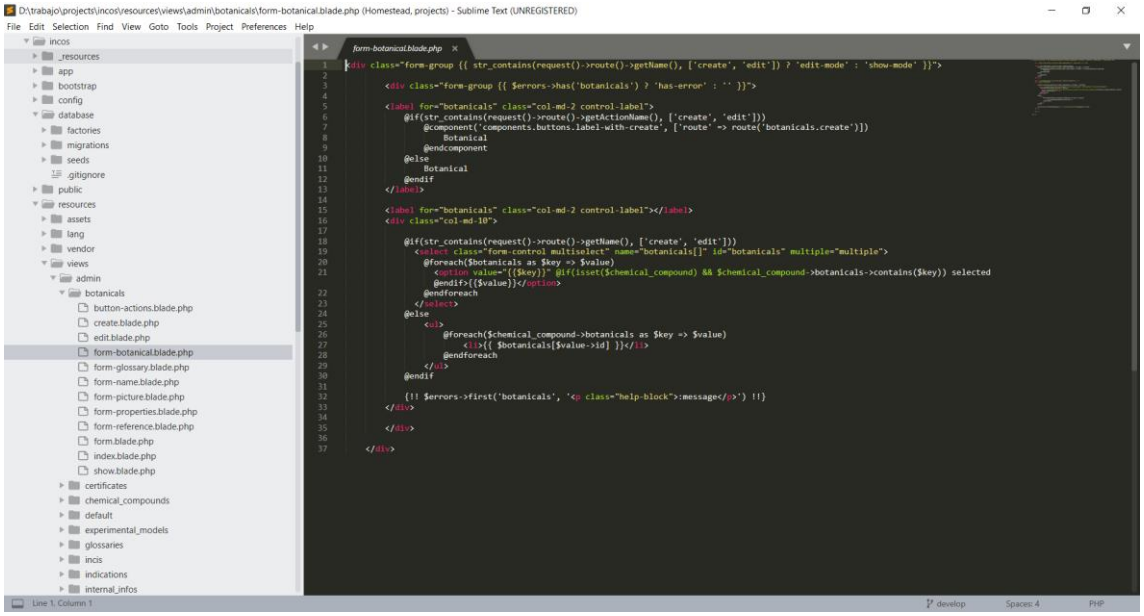


Figura 3.4.5. Carpeta “resources”, “views”, “admin”, vistas de nuestro proyecto, donde se diseña la parte visual. Ejemplo archivo formulario para la tabla “botanicals”.

La parte visual de la web se puede observar en la figura 3.4.6, ejemplo de índice de la tabla ingredientes, donde al final de cada línea se pueden observar tres botones: ver, modificar y borrar. Los datos se ordenan desde el último agregado al primero, de tal manera, que se observan las últimas actualizaciones primero. Por otro lado, a la derecha se sitúa un menú con la lista de tablas, y una herramienta de búsqueda o “search”, que permite buscar información de una manera más rápida.

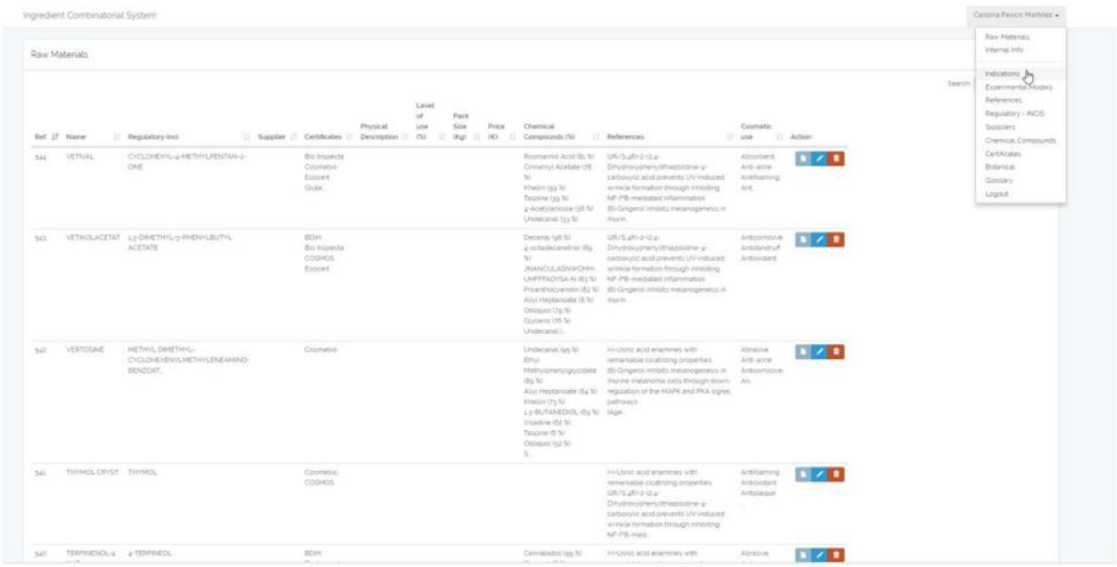


Figura 3.4.6. Página web con el diseño de la versión de los datos puros de la DB, ejemplo "raw materials" o ingredientes.

En esta parte se observan los datos incluidos en la DB, donde se pueden ver los datos, fecha de introducción y usuario que lo ha introducido o modificado. Esta información será de gran utilidad en el futuro, ya que permite conocer la trazabilidad de los datos y por lo tanto visualizar la actividad de los usuarios en nuestra herramienta. Finalmente, las tablas desarrolladas en este formato contienen la información pública, a excepción de la información del laboratorio que requiere ser desarrollado en un punto aparte más adelante, ya que su diseño y desarrollo implica mayor complejidad.

5. Diseño visual web de INCOS

El diseño de una web es un concepto de herramienta dedicada al usuario externo, de manera que los datos se visualizan de forma sencilla mediante gráficos o tablas resumen. Puesto que el usuario no tiene la obligatoriedad de conocer la herramienta, los datos se diseñaron de manera gráfica, visual e interactiva. El diseño se realizó mediante el uso de la herramienta Bootstrap explicada anteriormente.

La página principal o tablero (*Dashboard*), se divide en dos zonas (figura 3.5.1). En la parte superior derecha se sitúan cuatro cuadrados, en los que se resumen los datos más relevantes, número de ingredientes testados, número de modelos experimentales, número de proveedores y número de posibles combinaciones. Debajo de estas fichas, la página se divide en dos columnas; a la izquierda se observan una serie de gráficos, uno con el número

de ingredientes medidos por modelo experimental, y otro con el número de ingredientes por indicación; en el lado derecho se observa una tabla en la que el usuario puede ir seleccionando diferentes restricciones para obtener una propuesta de combinación de ingredientes. Estas restricciones limitan la búsqueda introduciendo las indicaciones que se quieran determinar, el número de ingredientes, si presentan restricciones, certificados o códigos china INCI. Estas selecciones permiten obtener una propuesta de combinación de ingredientes codificados, es decir, sin conocer el nombre real de cada ingrediente, ya que esta información se limita en función del usuario.

Figura 3.5.1. Tablero principal en formato web de INCOS.

En el lado izquierdo de la pantalla, se sitúa una lista de enlaces que permiten el acceso a otras páginas. Esta lista facilita al usuario nueva información de la empresa, como son las alertas de nuevos compuestos medidos. En la parte más baja de la lista se sitúan las tablas internas anteriormente desarrolladas, con restricción de usuario. Dentro del desplegable, se diseñaron dos tablas resumen, en la primera tabla se observan los ingredientes codificados frente a los modelos experimentales según el criterio de actividad de cada uno de ellos (figura 3.5.2). La segunda tabla, permite seleccionar una indicación para visualizar la tabla resumen anteriormente descrita pero solo con los modelos experimentales asociados a la indicación seleccionada (figura 3.5.3). Estas dos tablas resumen la información obtenida de los experimentos del laboratorio mediante la actividad de los ingredientes, codificados con el código interno del laboratorio.

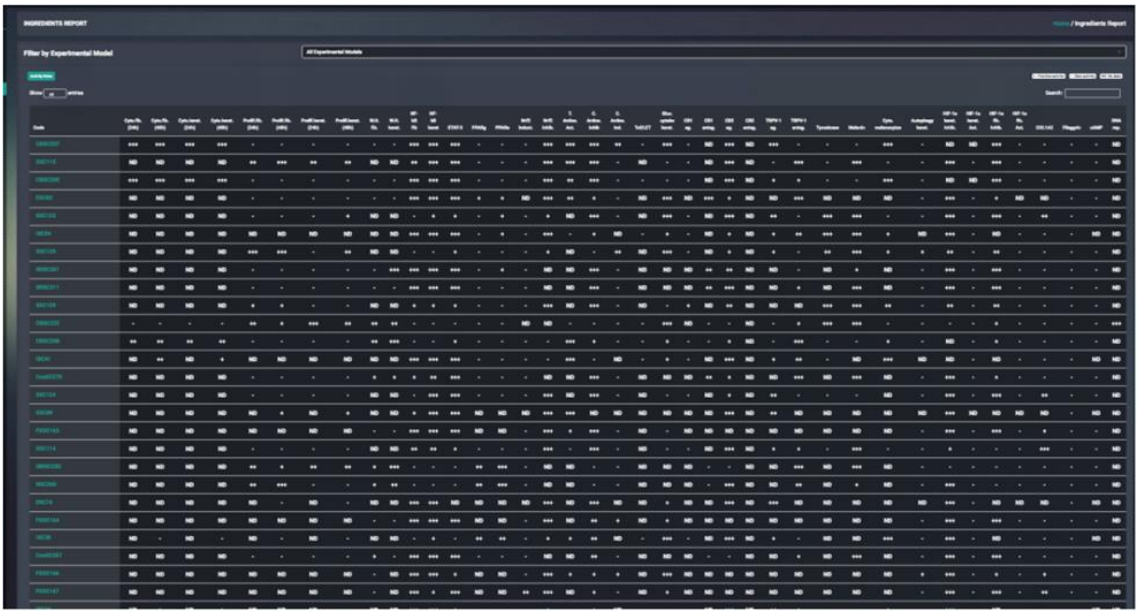


Figura 3.5.2. Tabla resumen de datos laboratorio por modelo experimental.

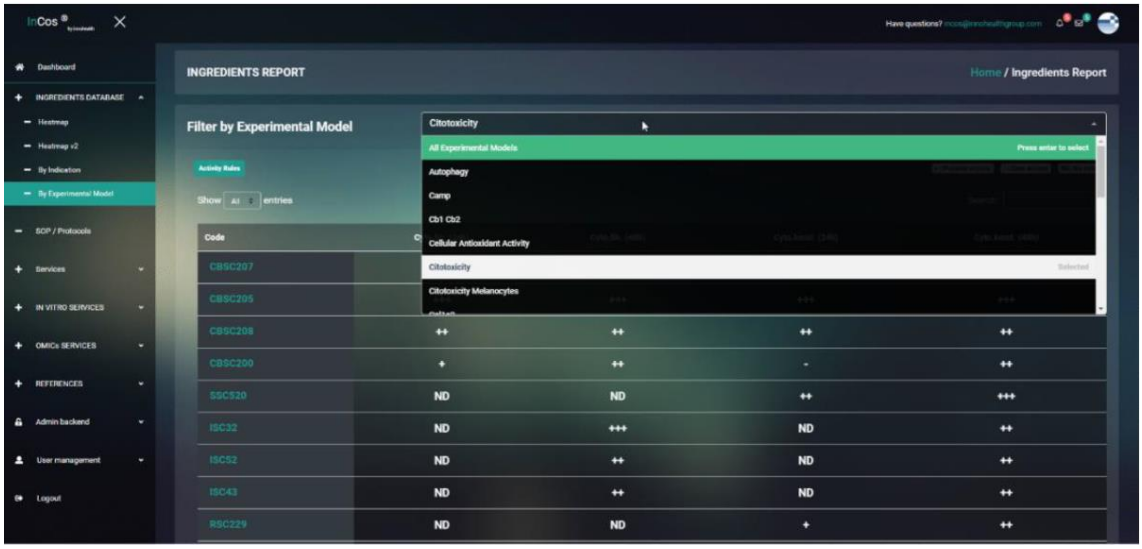


Figura 3.5.3. Tabla resumen de los ingredientes búsqueda por indicación.

Por otro lado, a partir de las tablas resumen el usuario puede acceder a la información detallada de cada ingrediente. Para ello, seleccionando un ingrediente permite el acceso a todos los experimentos realizados en el laboratorio. En los gráficos se observa un ingrediente medido en un modelo experimental representando en cada columna el porcentaje obtenido de los controles y las dosis junto con sus concentraciones. En cada gráfico se especifica el nombre del experimento y al situar el cursor sobre la columna se visualizan los valores en porcentaje (figura 3.5.4).

Figura 3.5.4. Resumen de datos de un ingrediente representados en gráficos en INCOS.

Por tanto, esta versión de INCOS es un paso preliminar y en constante evolución, ya que la utilización de la herramienta por diferentes usuarios permite incluir cambios con nuevos contenidos y nuevas visualizaciones que la mejoren.

6. Diseño de LIMS

LIMS o *Laboratory Information Managment System* es una herramienta interna que permite introducir, calcular y organizar todos los datos generados en el laboratorio. Las tablas asociadas a este sistema son: información interna, modelos experimentales, protocolos y la tabla "*well plates*" o pozos de placa, la cual contiene un resumen de las mediciones realizadas en el laboratorio.

En esta herramienta se diseñaron los pasos que realiza cada persona para plantear un experimento del laboratorio y poder introducir los datos en la herramienta. Para ello, primero se deben introducir los ingredientes nuevos que se desean medir en el laboratorio, es decir, introducir un ingrediente y asociar a un código interno (figura 3.6.1).

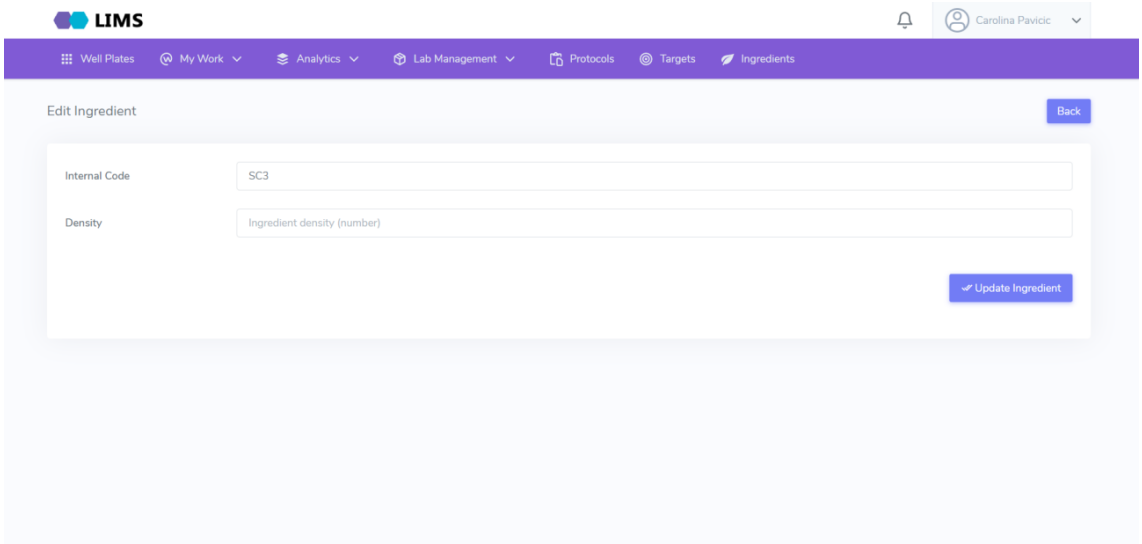
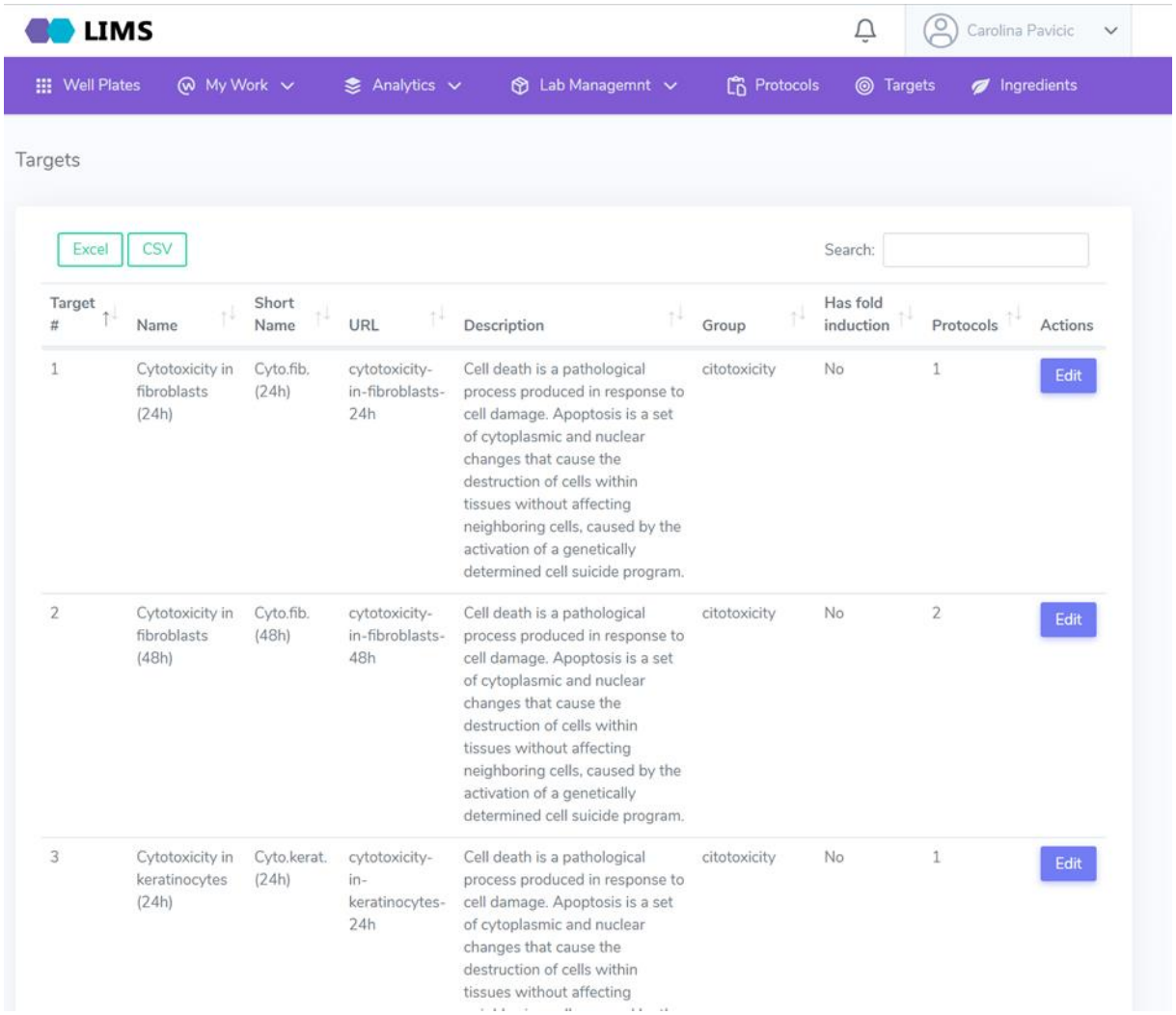


Figura 3.6.1. Introducción de un ingrediente, asociado a un código interno en LIMS.

El primer paso consiste en diseñar el modelo experimental que se va a medir. En la figura 3.6.2 se observa la lista de modelos experimentales que se pueden seleccionar, además de poder generar uno nuevo en caso de no estar incluido.



Target #	Name	Short Name	URL	Description	Group	Has fold induction	Protocols	Actions
1	Cytotoxicity in fibroblasts (24h)	Cyto.fib. (24h)	cytotoxicity-in-fibroblasts-24h	Cell death is a pathological process produced in response to cell damage. Apoptosis is a set of cytoplasmic and nuclear changes that cause the destruction of cells within tissues without affecting neighboring cells, caused by the activation of a genetically determined cell suicide program.	citotoxicity	No	1	Edit
2	Cytotoxicity in fibroblasts (48h)	Cyto.fib. (48h)	cytotoxicity-in-fibroblasts-48h	Cell death is a pathological process produced in response to cell damage. Apoptosis is a set of cytoplasmic and nuclear changes that cause the destruction of cells within tissues without affecting neighboring cells, caused by the activation of a genetically determined cell suicide program.	citotoxicity	No	2	Edit
3	Cytotoxicity in keratinocytes (24h)	Cyto.kerat. (24h)	cytotoxicity-in-keratinocytes-24h	Cell death is a pathological process produced in response to cell damage. Apoptosis is a set of cytoplasmic and nuclear changes that cause the destruction of cells within tissues without affecting	citotoxicity	No	1	Edit

Figura 3.6.2. Modelos experimentales para seleccionar introducidos en LIMS.

Para realizar este primer paso, se selecciona el modelo experimental junto con el protocolo (figura 3.6.3). En caso de realizar algún cambio en el protocolo, se aplicará un paso previo donde la herramienta permite generar uno nuevo que especifique los cambios.

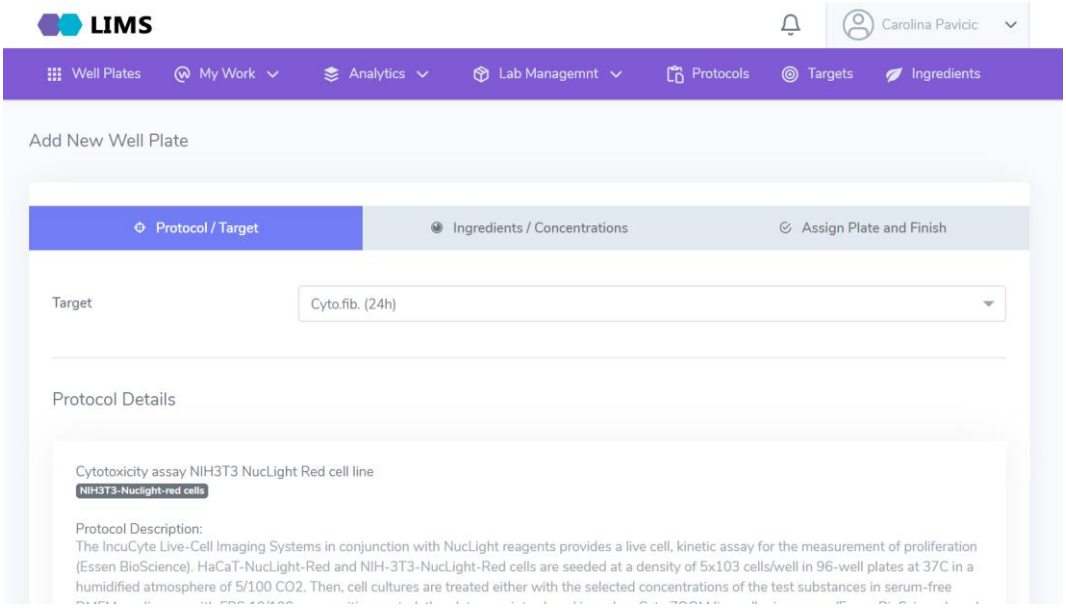


Figura 3.6.3. Primer paso en el diseño de un experimento en LIMS. Selección del modelo experimental y el protocolo.

El segundo paso consiste en añadir los ingredientes que se quieren medir junto con las dosis de cada uno de ellos. Para ello, la herramienta permite introducir varios ingredientes e ir asociando la dosis o concentración, junto con sus unidades de medida. Para este paso se ha de tener en cuenta el protocolo seleccionado, ya que permite saber que placa se va a utilizar, número de pocillos y por lo tanto el número de ingredientes que se pueden introducir en nuestra medida (figura 3.6.4).

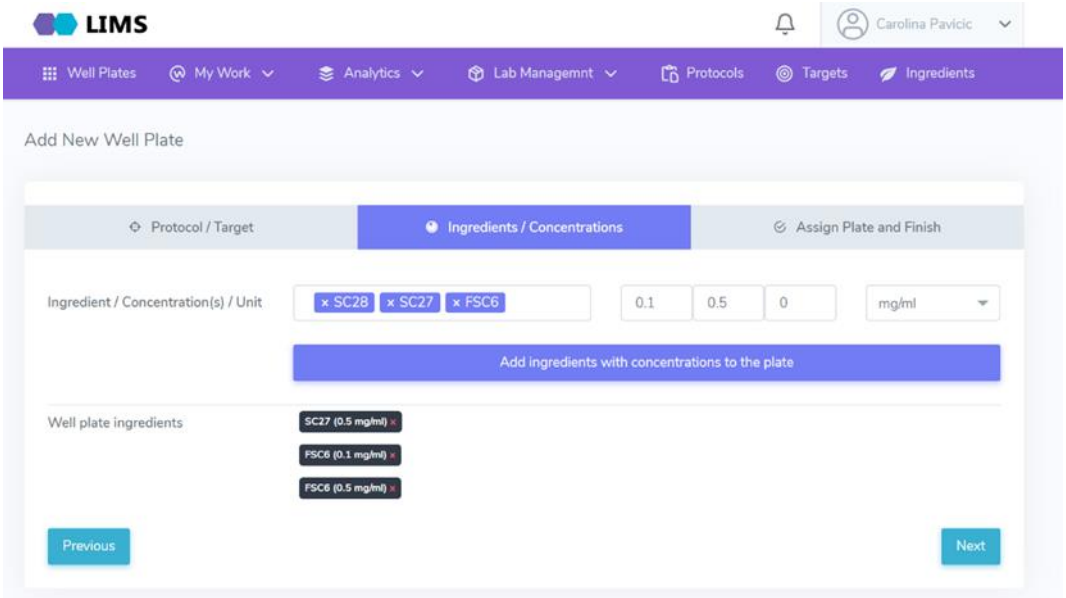


Figura 3.6.4. Segundo paso en el diseño de un experimento en LIMS. Selección de los ingredientes y sus dosis.

El tercer paso permite a la persona encargada asociar este experimento a un técnico. Una vez asignado a la persona correspondiente, este puede revisar el trabajo a realizar y crear una placa en blanco, es decir, una plantilla base de su placa, donde se especifica cada control e ingrediente y su dosis correspondiente en la posición de la placa a medir (figura 3.6.5).

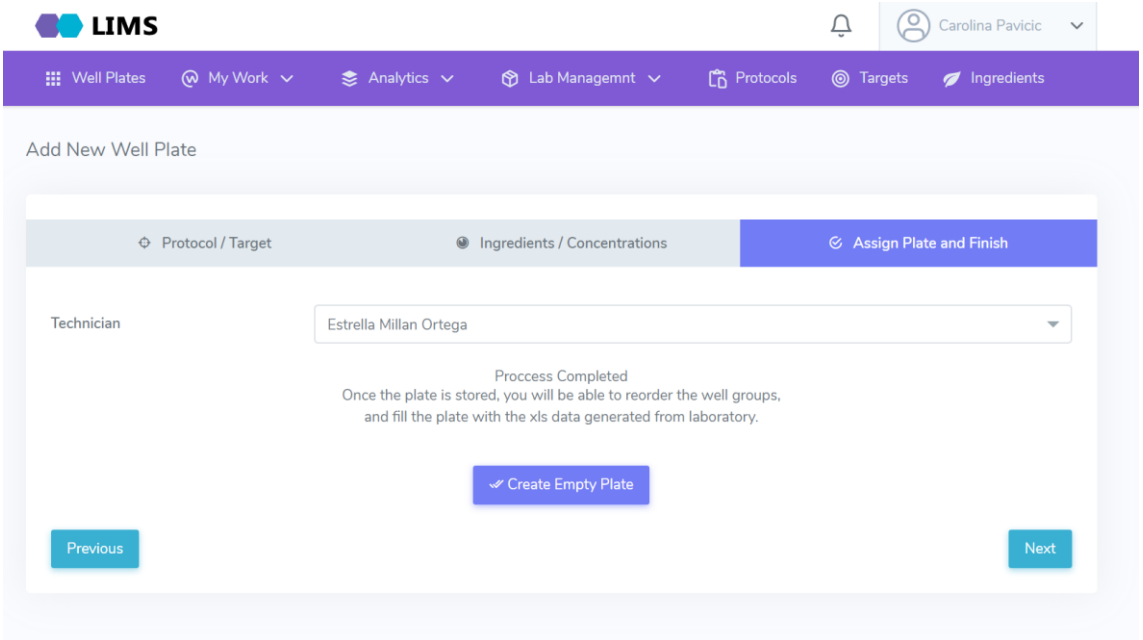


Figura 3.6.5. Tercer paso en el diseño de un experimento en LIMS. Asignación al técnico para medir el experimento con los ingredientes y dosis.

Finalmente, una vez realizado el experimento, el operador introduce los datos de la placa medida importando un archivo Excel, donde los datos se sitúan en la misma posición de la plantilla generada en el paso anterior. Una vez añadidos los datos, los valores se observan como se muestra en la figura 3.6.6. Finalmente, se comprueba que los datos son correctos, que cada ingrediente está situado en el mismo sitio de la plantilla junto con su dosis. Se puede observar en la parte inferior de cada grupo de medida, el cálculo matemático obtenido automáticamente, permitiendo realizar una comprobación tanto de los datos como de los cálculos finales. Por otro lado, en la parte superior se especifica el protocolo aplicado, el tipo de células usadas, las medidas realizadas, los controles e inductores aplicados, la fecha y el tiempo de realización del experimento.

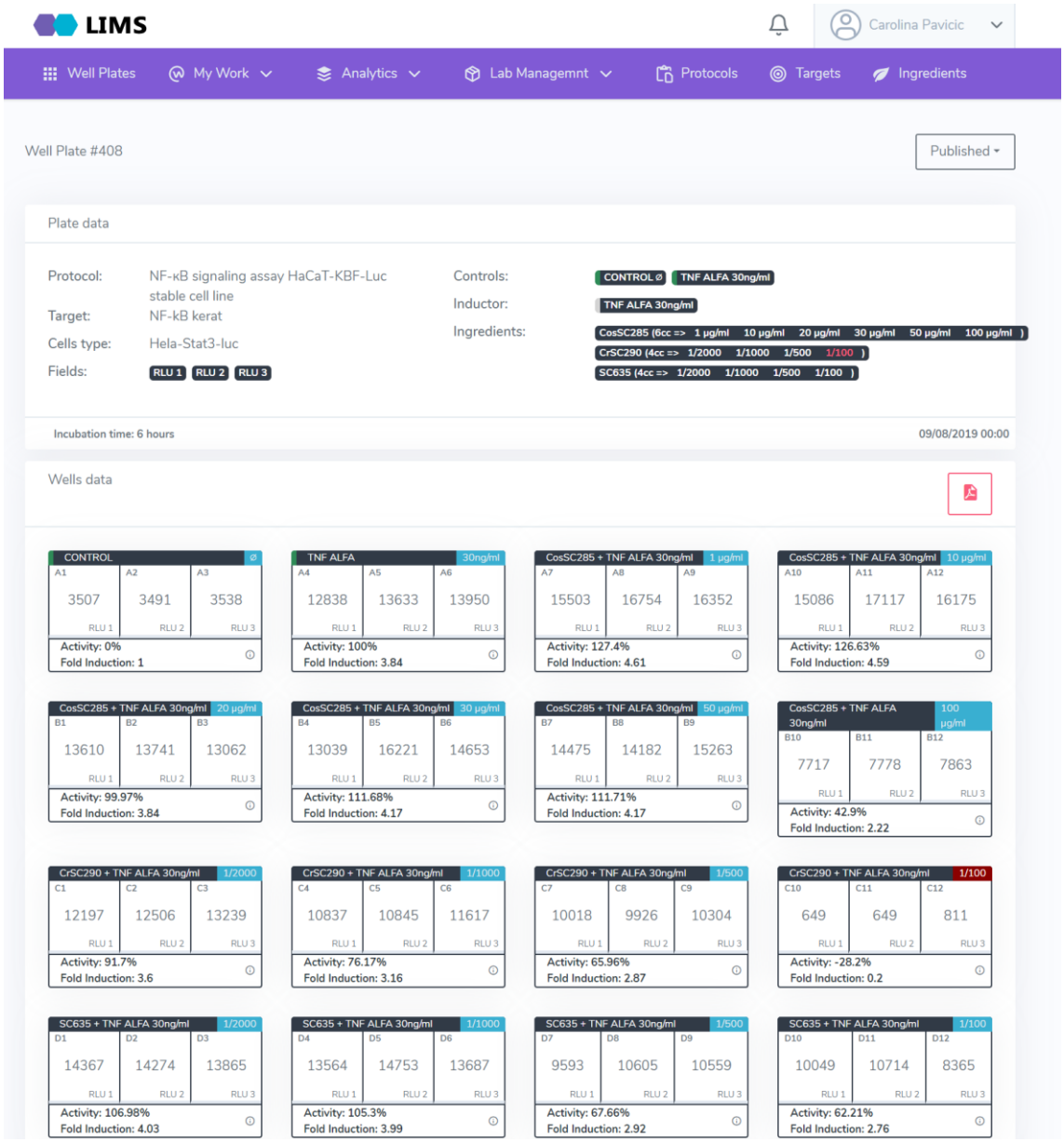


Figura 3.6.6. Importación de los datos obtenidos en el laboratorio a la herramienta y validación de los cálculos aplicados.

En este formato no solo se validan y comprueban los datos, sino que también se pueden editar y modificar si no están correctamente situados. Por otro lado, debido a que durante el experimento pueden surgir anomalías, las cuales conviene incluir, se ha diseñado una función donde añadir comentarios a cada medida. En la figura 3.6.7. se observa el formulario donde se realizan las modificaciones y cambios, y permite añadir comentarios observados en cada medida, además de especificar si es tóxico y si el valor se tiene o no en cuenta.

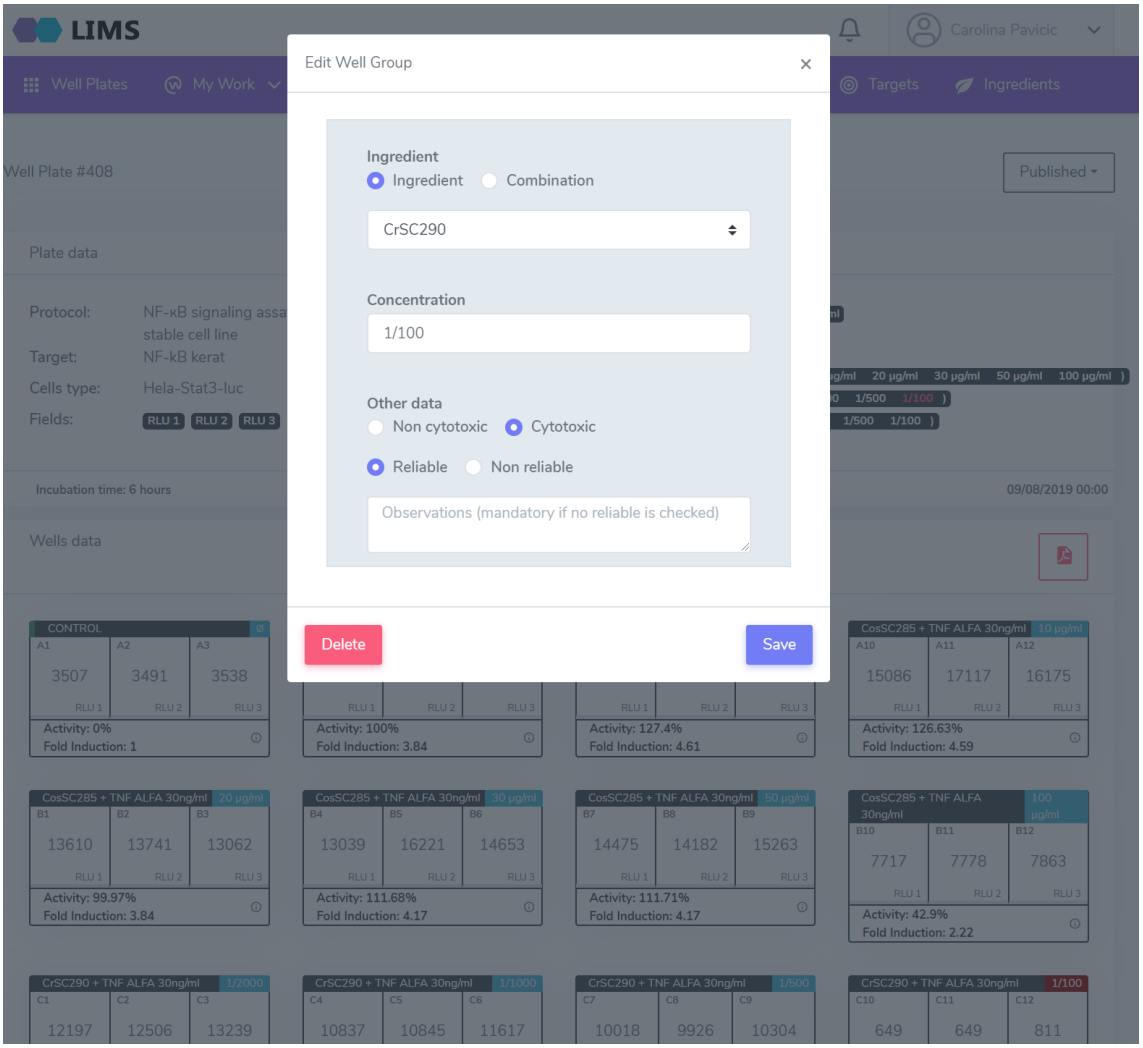


Figura 3.6.7. Edición de las mediciones realizadas en el experimento, permite incluir si es o no citotóxico, si es o no fiable el dato y las observaciones.

Una vez finalizadas las comprobaciones se acepta la placa y la persona responsable confirmará si todo es correcto. Cada usuario podrá observar sus experimentos realizados, y el usuario administrador será el que pueda acceder a toda la información. En la figura 3.6.8 se observa esta tabla final con todas las placas, el modelo experimental en el cual se han realizado, los ingredientes medidos y la fecha. El botón de editar permitirá visualizar la información completa como se ha observado en la figura anterior.

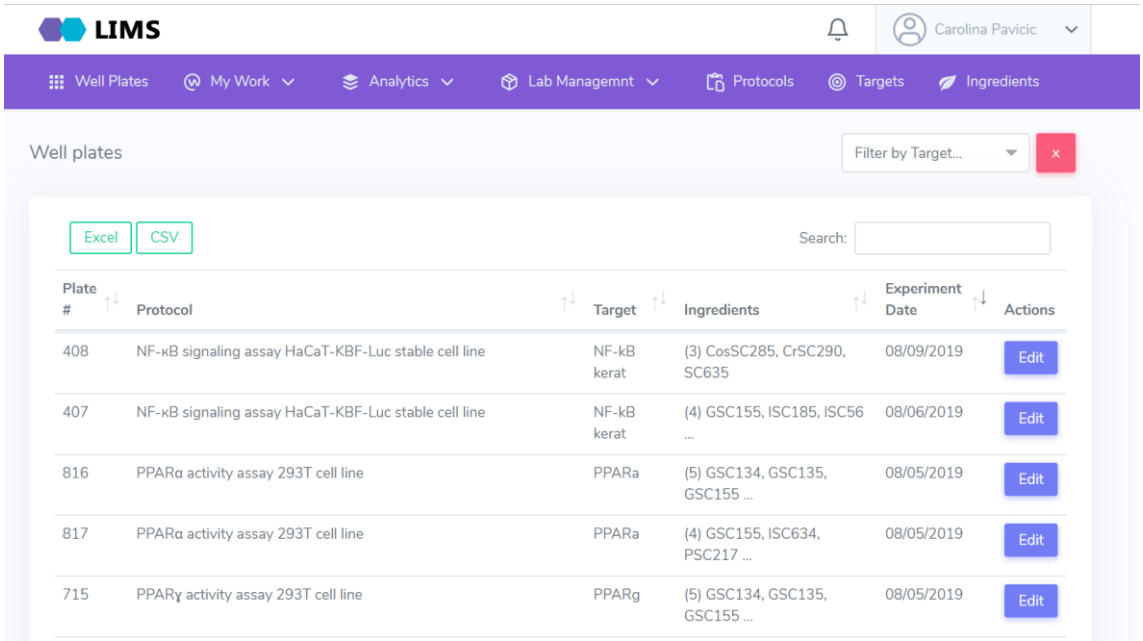


Figura 3.6.8. Lista de placas añadidas. Se detalla el protocolo, modelo experimental, ingredientes y fecha en la que se ha realizado.

Por otro lado, esta herramienta permite editar, añadir y eliminar los modelos experimentales, protocolos, ingredientes y todo lo relativo a las tablas internas. Es decir, permite editar toda la información interna del laboratorio. En la figura 3.6.9. se observar un ejemplo de edición del protocolo de reparación del ADN (*DNA repair*).

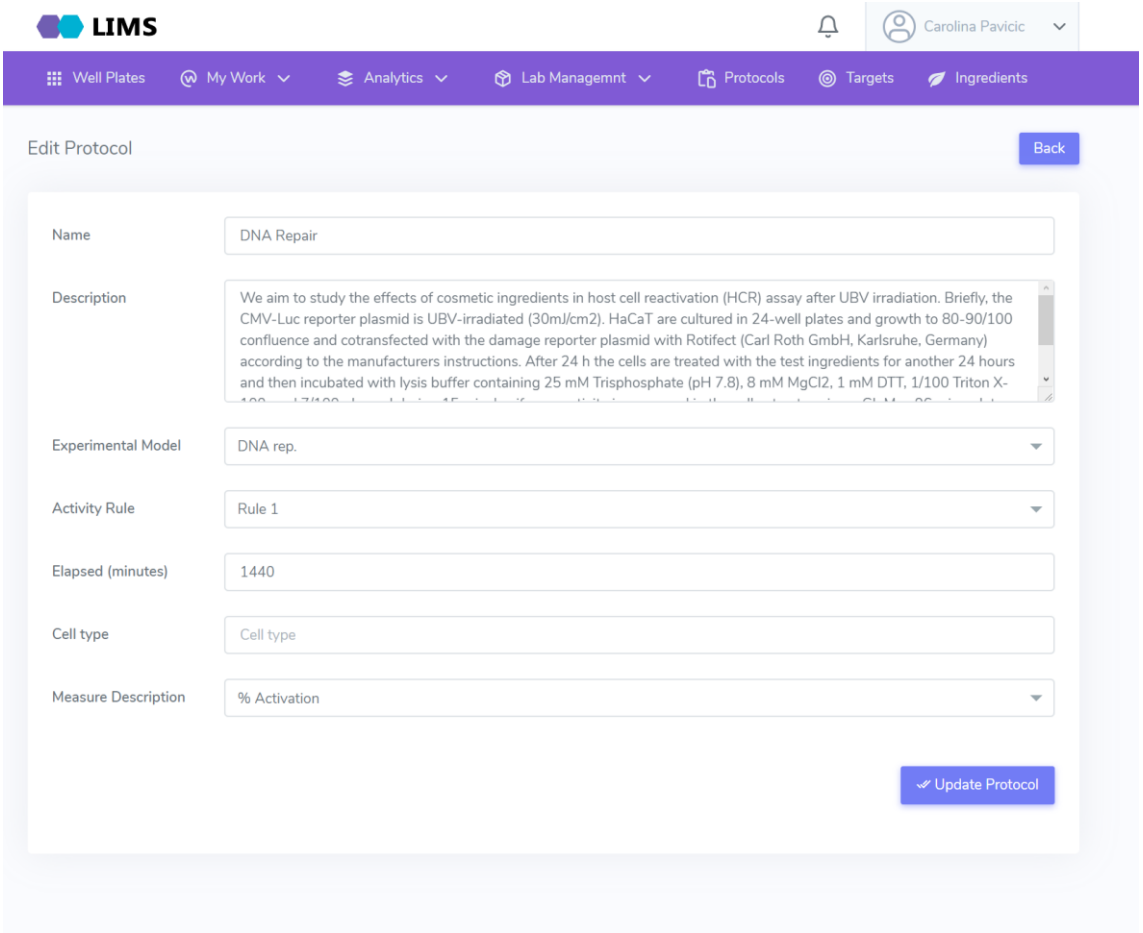


Figura 3.6.9. Edición del protocolo *DNA repair*.

Al incluir todos los datos experimentales desde años anteriores, esta herramienta permite realizar una trazabilidad de la actividad del laboratorio, desde la llegada de un ingrediente, especificando cuando se ha comprado, el lote y caducidad, hasta los experimentos ya realizados, concretando el usuario y los datos obtenidos. Facilita el trabajo interno, mediante la introducción de los datos automáticamente, además de calcular las reglas matemáticas sin errores, estableciendo como último paso la comprobación de los datos. Facilitar todo este proceso es fundamental para mejorar el trabajo interno, donde a tiempo real se pueden observar los resultados. Además, todos estos datos se pueden exportar a un Excel junto con sus correspondientes gráficos, pudiendo, por otro lado, generar también informes de manera automática.

En cualquier laboratorio, tener este tipo de sistemas mejora la actividad del trabajo, donde más del 50% de la labor consiste en el tratamiento de datos y elaboración de informes. Así pues, desarrollar esta herramienta es un paso fundamental en el desarrollo y ampliación del trabajo interno, donde ese tiempo implicado se podrá redistribuir en otras tareas o trabajos

que se quieran desarrollar. Finalmente, mejora la calidad de los datos, su trazabilidad y la mejora del proceso. En un futuro se podrán incluir otros datos como las compras y el stock de los materiales necesarios en el laboratorio, y realizar un seguimiento de estos.

7. Algoritmo de combinación

Los ingredientes activos en un cosmético describen la función del producto y por ello obtener la información detallada de cada componente optimizará su uso y aplicación. La base de datos permite incluir toda la información necesaria para conocer un ingrediente, desde el punto de vista bibliográfico, químico y bioquímico.

Conocer un ingrediente es algo fundamental, pero en un producto no se encuentra un solo ingrediente ya que normalmente son varios ingredientes combinados para esa aplicación. Un ingrediente presenta una dosis óptima por modelo experimental, pero si se incrementa la dosis se puede producir el efecto contrario. Por ello, si combinamos dos ingredientes aptos para una ruta sin conocer su dosis óptima se puede obtener una acción potenciada o un efecto antagónico no deseado. Por ello, esta información es fundamental en el desarrollo de un producto, ya que favorece el conocimiento de si se complementan o son antagónicos y sus dosis óptimas de acción.

En la base de datos se ha incluido una tabla de combinaciones que incorpora información de una combinación especificando los ingredientes y sus diferentes dosis. Aunque se sitúa en una nueva tabla para diferenciarlo, los resultados se tratan como si fuera un ingrediente. Esta nueva tabla permite ampliar nuestro conocimiento de los ingredientes y buscar patrones de comportamiento de cada ingrediente tanto individual como en combinación.

Un algoritmo es un modelo matemático de operaciones organizadas de manera lógica y ordenada que busca resolver problemas multiparamétricos para soluciones simples. El actual algoritmo evolutivo se basa en métodos metaheurísticos inspirados en la evolución biológica, donde optimiza una solución dentro de un rango de tolerancia. Es un método iterativo de búsqueda que selecciona iterativamente una serie de individuos de manera alternativa donde se califican los ingredientes en cada iteración y se seleccionan los mejores descartando los peores. De esta manera, después de un número de iteraciones se obtiene la mejor solución a esa indicación inicialmente seleccionada. Este método depende de la valoración de los ingredientes, los cuales se califican según el número de actividades del ingrediente en los modelos experimentales, restando el número de actividades de los

modelos antagónicos, y multiplicando por la actividad. Esta calificación se normaliza de 0-100, donde 0 es el valor de no actividad y 100 es el máximo valor de actividad de ese ingrediente. Para aplicar este algoritmo se deben definir ciertos parámetros: número de tuplas, codificación en bits de cada ingrediente para seleccionarlo aleatoriamente, tamaño de la población, número de ingredientes seleccionados en cada paso, número de épocas, número de iteraciones que se usará en el proceso, y tasa de mutación, variación de los ingredientes para reelegirlos en cada iteración. La variación de estos parámetros determina la validez de este método.

Este algoritmo ofrece una lista de ingredientes más aptos para una indicación determinada pero no da la relación entre ellos. Existen tres tipos de relaciones de actividad entre ingredientes: en primer lugar, la actividad aditiva es la suma de las actividades de cada ingrediente; en segundo lugar, la actividad sinérgica es la acción conjunta de dos o más ingredientes, donde la actividad es mayor que la suma de actividades de cada ingrediente e implica una reducción de la dosis de cada ingrediente, para no obtener un efecto tóxico que enmascare la actividad positiva de la combinación. Finalmente, la actividad antagónica se determina por una disminución de la actividad en combinación a las actividades de cada ingrediente por separado. Con estas definiciones, el objetivo es obtener una sinergia en las rutas bioquímicas implicadas en la indicación y producir efectos antagónicos en las rutas que no se desea una actividad. En la figura 3.7.1 se puede observar este efecto entre dos ingredientes.

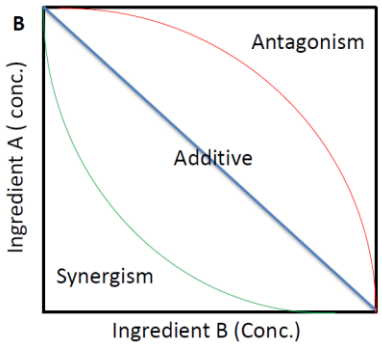


Figura 3.7.1. Representación de actividad de dos ingredientes, donde la suma de las actividades es aditiva, línea azul, una actividad mayor que la suma es sinergia, línea verde, y antagonismo es menor concentración que la suma, línea roja.

Los ingredientes introducidos en la DB se han clasificado según su composición, donde la mitad son compuestos químicos y la otra mitad son extractos. Los compuestos químicos son las moléculas encargadas de producir la actividad en un modelo experimental, por ello, se ha introducido el análisis de cada ingrediente tanto de origen químico como botánico. Se planteó la posibilidad de establecer una correlación entre un compuesto químico y un conjunto de ingredientes donde esté presente ese mismo compuesto y así poder estimar su actividad. Esta comparación permite encontrar un patrón de actividad que se puede aplicar en la búsqueda de combinaciones. Para determinar esta primera premisa se realizaron varios pasos:

Primero, se realizó una selección entre los modelos experimentales, seleccionando los modelos asociados a inflamación: NF-κB fibroblastos, Nrf2 inducción e inhibición, TRPV1 agonismo y antagonismo, CB_1R agonismo y antagonismo y CB_2R agonismo. Segundo, se clasificaron los 600 ingredientes por similitud de composición química, eligiendo un ingrediente activo y buscando su homólogo con similitud de composición química, o con compuestos principales iguales (tabla 3.7.1).

Tabla 3.7.1. Selección de compuestos similares por composición química.

Ingredientes	Composición química	Ingredientes homólogos
ISC36	Centella Asiatica Extrait Purifie Sec. (Centella asiatica leaf extract) linalool, terpineol, geraniol, elemene, decyl acetate, caryophyllene, humelene, farnesene, acoradiene, germacrene, aristolochene, viridiflorene, bycyclogermacrene, nerolidol, spathulenol, caryophyllene oxide, bisaboladienol, muurolol, mintsulfide, asiacoside, asiatic acid, madecassic acid	ISC56, ISC32, ISC49
ISC40	Green Coffee Dry Hydroalcoholic Extract (Coffea Arabica Fruit Extract) caffeoulquinic acids, caffruenol, caffeine, trigoneline	SC34, ISC184
CBSC200	Uncaryl: uncaria tomentosa extrat (hydroxybenzoic acid; benzoic acid; salicylic acid; 4-hydroxybenzoic acid; prochatechuic acid; gallic acid; syringic acid; vanillic acid; hydroxycinnamic acid; p-coumaric; caffeic; ferulic; isoferulic acid; flavan-3-ols; catechin; epicatechin; procyanidin; 18,19-dehydrocorynoxinoic acid; benzoic acid; salicylic acid; gallic acid; vanillic acid; syrindic acid; caffeic acid; ferulic acid; catechin)	FSC9, SSC118, GSC141, GSC152
CBSC208	Dragon´s Blood (Propanediol, Water, Croton Lechleri Resin Powder) catechin, gallocatechin, epigallocatechin, epocatechin, taspine, sitoesterol, bincatriol, crolechinol, daucosterol, isoboldine, norisoboldine, marnoflorine	ESC74, CosSC285, FSC6
ESC82	Tego xymenynic (caprylic acid; capric triglyceride; xymenynic acid; tocopherol)	ISC50, SSC127, GSC135, SOSC194, CBSC205, RSC230, NSC265
CBSC197	Allantoin; elastin; collagen; glycolic acid; vitamin	CBSC198, CBSC199

Por último, se seleccionaron seis ingredientes y seis homólogos por actividad, donde se observó que A y A' son similares en composición química y similares en actividad en los modelos experimentales seleccionados (Tabla 3.7.2.). Las medidas se realizaron por una combinación del compuesto A con los 6 ingredientes y A' con los ingredientes homólogos (Tabla 3.7.3). Se realizaron medidas de 5 dosis de cada combinación, para determinar un amplio rango de actividad.

Tablas 3.7.2. y 3.7.3. Compuestos seleccionados y combinaciones entre los compuestos.

Ingredientes	Ingredientes Homólogos	Código
ISC36	ISC49	A
	ISC56	A’
ISC40	SC34	B
	ISC184	B’
CBSC200	GSC141	C
	GSC152	C’
CBSC208	ESC74	D
	CosSC285	D’
ESC82	RSC230	E
	NSC265	E’
CBSC197	CBSC198	F
	CBSC199	F’

Combinaciones de ingredientes
A + B
A + C
A + D
A + E
A + F
A’ + B’
A’ + C’
A’ + D’
A’ + E’
A’ + F’

El objetivo principal de los experimentos era observar patrones de actividad entre combinaciones de compuestos similares y dentro del mismo modelo experimental. Después de obtener los resultados, comparando las tablas 3.7.4. y 3.7.5., las primeras observaciones fueron las siguientes:

- El principal problema observado tiene su origen en la base de datos, donde los compuestos elegidos no se han medido en todos los modelos experimentales, eso impide la observación de patrones claros entre los ingredientes de manera individual y en combinación.
- En el modelo experimental NF-κB se observó que todas las combinaciones son negativas, aunque ciertos ingredientes individuales son positivos, el patrón observado es la no actividad en esta diana.
- En el modelo experimental Nrf2 inducción, la combinación A’ B’ es positiva, donde los ingredientes son negativos por separado. Por lo tanto, se puede observar cierta sinergia, pero la combinación análoga A B es negativa tanto en combinación como individualmente, por lo que, no se ha podido determinar un patrón de correlación claro. Por otro lado, las combinaciones A’ E’ y A E que son positivas, se puede observar una correlación sinérgica entre estos ingredientes, pero actualmente no se tiene conocimiento de la actividad del compuesto E en este modelo experimental, por lo tanto, no se puede obtener una conclusión objetiva.
- En el modelo experimental Nrf2 inhibición se observó que la combinación A B es positiva y la combinación A’ B’ es negativa, por lo que impide la obtención de resultados claros. Además, los compuestos B y B’ son negativos, pero

desconocemos la actividad de A y A', por lo que no se conoce si la actividad positiva tiene su origen en una sinergia o en un compuesto concreto.

- En el modelo experimental CB_1R agonismo se obtienen actividades negativas en todas las combinaciones. En el caso del modelo CB1 antagonismo, las combinaciones A C y A' C' son positivos, por lo que existe una relación de comportamiento entre ambos compuestos, pero desconocemos sus actividades individuales, salvo el caso de A' que es negativa.
- En el modelo experimental CB_2R agonismo, se observan las combinaciones A E positiva, y A' E' negativa, ocurre lo mismo para el caso de A' D' que es positivo, y A D que es negativo, donde cabe destacar que los compuestos E' y D son positivos y en combinación son negativos.
- En el modelo experimental TRPV1 agonismo se determinó que todas las combinaciones son negativas. En el caso TRPV1 antagonismo, se observaron que la combinación A' B' es positivo, y la A B es negativo. Ocurre lo mismo para el caso A' D' es positivo, pero A D no.

El resto de las combinaciones que no se han nombrado debido a que no se puede establecer conclusiones, ya que no se han medido de manera individual los ingredientes, o no se ha obtenido una relación clara entre las medidas.

Tabla 3.7.4. Actividad de los compuestos seleccionados.

Código	Ingredientes	Nf-kB fibroblastos	Nrf-2 Inducción	Nrf-2 Inhibición	TRPV-1 agonista	TRPV-1 antagonista	CB1 agonista	CB1 Antagonista	CB2 agonista
A	RSC230	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
B	SC34	ND	-	-	-	+++	ND	ND	++
C	GSC141	-	++	-	ND	ND	ND	ND	ND
D	ESC74	+++	ND	+++	+++	ND	ND	ND	+++
E	ISC49	-	-	-	-	+++	-	ND	-
F	CBSC198	-	-	-	-	+++	-	ND	+
A'	NSC265	-	-	ND	ND	++	ND	-	+++
B'	ISC184	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
C'	GSC152	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND
D'	CosSC285	-	-	ND	ND	+++	ND	-	-
E'	ISC56	-	-	-	-	+++	ND	-	ND
F'	CBSC199	-	-	-	-	+++	-	ND	-

Tabla 3.7.5. Resultados de combinaciones.

Combinaciones	Nf-kB fibroblastos	Nrf-2 Inducción	Nrf-2 Inhibición	TRPV-1 agonista	TRPV-1 antagonista	CB1 agonista	CB1 Antagonista	CB2 agonista
A + B	-	-	+	-	-	-	-	-
A + C	-	-	-	-	-	-	+	-
A + D	-	-	-	-	-	-	-	-
A + E	-	-	-	-	-	-	-	+++
A + F	-	-	-	-	-	-	+	-
A' + B'	-	+	-	-	+++	-	-	-
A' + C'	-	-	-	-	-	-	+	+
A' + D'	-	-	-	-	+++	-	-	++
A' + E'	-	+	-	-	-	-	-	-
A' + F'	-	-	-	-	-	-	-	-

De esta primera aproximación se deduce que no se ha planteado correctamente, ya que no se dispone de toda la información necesaria para establecer correlaciones entre los ingredientes seleccionados. Por ello, se planteó el experimento desde otro punto de vista.

Se partió del porcentaje de actividad de los ingredientes, tanto de compuestos químicos como de extractos, donde se puede establecer una correlación de actividad en todos los modelos experimentales medidos. Para ello, se realizó una clasificación de ingredientes con similitud en composición química, agrupando los compuestos químicos puros junto con los ingredientes donde estaba presente. Con estos datos se realizó un mapa de calor, donde se sitúan los ingredientes con el porcentaje de actividad para determinar patrones de actividad.

Aunque se realizó el ejercicio con todos los ingredientes no todos se aplican de igual manera en un producto, ni tampoco cumplen la misma función. Actualmente, de los 600 ingredientes incluidos en la DB, el 50% son extractos, el 30% son compuestos químicos y el 20% son aceites esenciales. Esto implica que, a parte de su actividad, hay que tener en cuenta el tipo de ingrediente y su función dentro de un producto.

En los mapas de calor se pueden observar patrones de actividad entre ingredientes en cada modelo experimental, de manera que se puede determinar un comportamiento entre los ingredientes con compuestos comunes. Por ello, se realizó un análisis de los compuestos mayoritarios en la DB, presentes en los compuestos y permitiendo compararlos con los extractos donde estén presentes. Para mejorar estas observaciones se medirán en el laboratorio los compuestos puros que no estén medidos actualmente y se completarán los experimentos no realizados, ayudando de esta forma a concretar esta premisa.

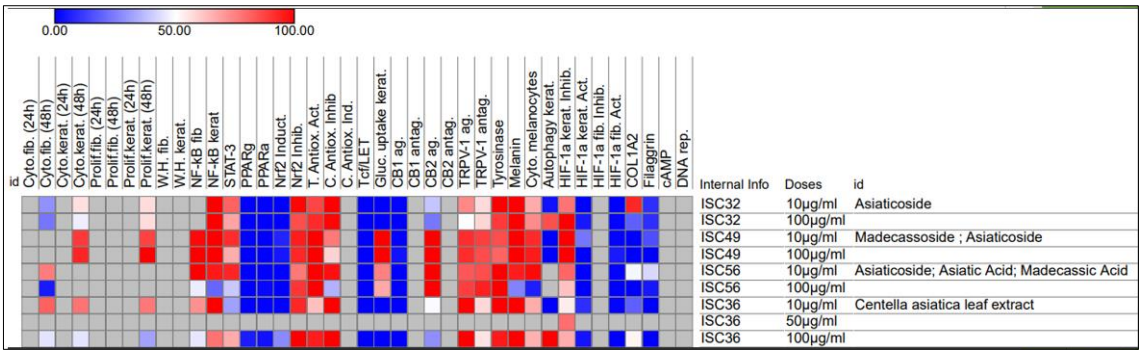


Figura 3.7.2. Diagrama de calor donde se representa una comparación de ingredientes con asiaticósido.

En la figura 3.7.2 se pueden observar las correlaciones establecidas en modelos experimentales en el ejemplo del compuesto asiaticósido presente en cuatro ingredientes, pero el principal problema observado es el análisis completo de los datos. Por ello, aunque no se pueden observar los resultados en todos los modelos experimentales, si se puede determinar que en ciertas dianas existen similitudes y patrones de actividad en función de la composición mostrando un comportamiento común.

Para incluir estas conclusiones en nuestra base de datos se procedió a completar las mediciones en los modelos experimentales que no se habían realizado. Este proceso requiere un largo tiempo para su realización. El siguiente paso para proponer sería restructurar el primer experimento de combinaciones entre ingredientes, donde los compuestos puros se combinen con ingredientes homólogos que permitan correlacionar la actividad de un ingrediente. A partir de esta premisa se podrán incluir patrones de actividad entre compuestos.

Por otro lado, la actividad de los ingredientes siempre es observada por cada modelo experimental. Para establecer una correlación entre las dianas se añadió una nueva columna a nuestra base de datos, donde se relaciona un modelo experimental con una indicación mediante una ponderación que permita valorar su peso o preferencia. Para ello, se establecen los modelos agónicos y antagónicos en cada indicación.

Los experimentos incluidos en la base de datos se realizan aplicando un primer experimento que incluya dos dosis por medida de cada ingrediente. En el caso de observar que una actividad es positiva, se realizará un segundo experimento donde se incluya una tercera dosis. Las dosis están estipuladas de manera constante diferenciando entre compuestos sólidos y líquidos. Estas medidas estándar permiten poder establecer correlaciones entre compuestos de igual estado, pero impide establecer correlaciones entre compuestos

líquidos y sólidos. Por ello, no se puede establecer una comparación de actividad entre compuestos con diferentes medidas de dosis. Para el caso de compuestos químicos se puede obtener su peso molecular y así determinar una concentración, pero no todos los compuestos son puros y un alto porcentaje son extractos. Es decir, las aproximaciones actuales realizadas consideran que las concentraciones o dosis son equivalentes, siendo una aproximación inicialmente errónea.

Por todo ello, el algoritmo se ha realizado mediante una ponderación de las premisas anteriores. En el primer paso se seleccionaron una lista de restricciones que permitían la búsqueda de ingredientes. La primera restricción permitió seleccionar las indicaciones para las cuales se buscaba la combinación, es decir focalizaba la selección a los modelos experimentales asociados a esas indicaciones. La segunda restricción permite seleccionar los certificados, es decir, si los ingredientes incluyen certificados necesarios para el desarrollo del producto final. La siguiente restricción selecciona si los ingredientes presentan restricciones, según la regulación europea ciertos ingredientes presentan restricciones de uso, por ello, el usuario puede especificar obtener ingredientes con o sin restricciones, es decir, susceptibles de limitaciones en el producto final. Otra restricción selecciona la nomenclatura China INCI que permite seleccionar los ingredientes con esta nomenclatura permitiendo la venta de productos en ese país. Finalmente, permite seleccionar el número de ingredientes que se quiere obtener en la combinación. En la figura 3.7.3 se puede observar la parte visual donde se introducen estos parámetros.

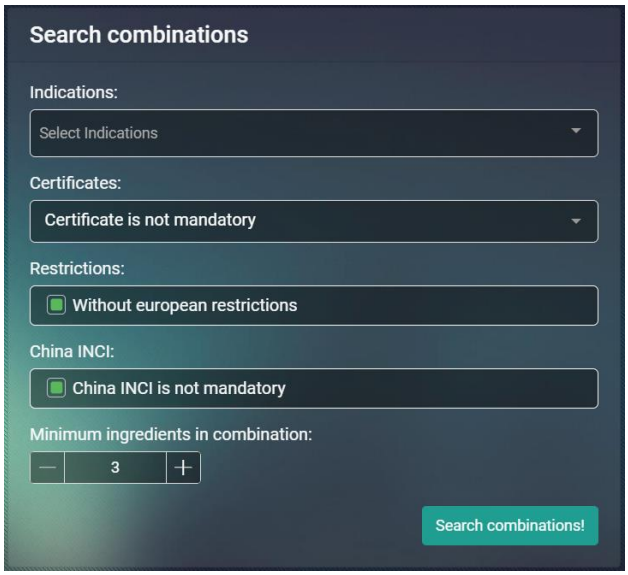


Figura 3.7.3. Restricciones aplicadas a la búsqueda de combinaciones.

Una vez seleccionadas las restricciones, se establece en una relación matemática donde se ponderan los ingredientes mediante una ecuación heurística incluyendo los factores antes expuestos. Esta ponderación permite obtener los mejores ingredientes aplicados a las restricciones seleccionadas anteriormente. El primer paso implica la selección de ingredientes, eliminando de la lista los ingredientes que no se ajustan a las restricciones seleccionadas. El segundo paso, valora los ingredientes por actividad en los modelos experimentales y se multiplica por el peso o valor que tiene ese modelo para esa indicación. La ecuación permite obtener los ingredientes con mejor actividad en los modelos preseleccionados e incluir una valoración de los modelos antagónicos definidos para cada indicación.

Esta ponderación permite un primer planteamiento donde se obtiene una propuesta de combinación, ya que actualmente no se han podido incluir los datos de los patrones observados, debido a la falta de conclusiones que puedan relacionar los patrones o estructuras químicas con la búsqueda. En la figura 3.7.4. se puede observar el archivo donde se ha desarrollado la programación para esta función.

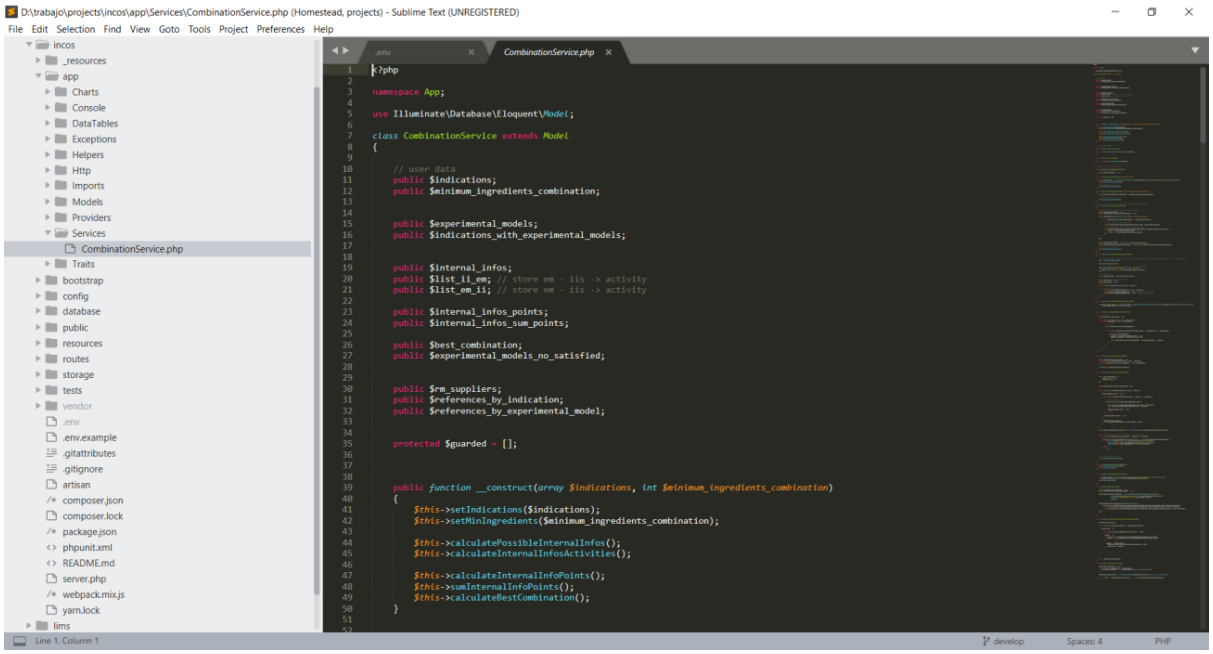


Figura 3.7.4. Programación de combinación de ingredientes.

Las conclusiones planteadas a partir de los patrones de compuestos químicos serán incluidas en la ecuación matemática una vez finalizadas las medidas de todos los experimentos. Sin la información completa de todos los experimentos no se puede asegurar que los patrones estén claramente definidos y las conclusiones permiten establecer el patrón

de comportamiento en los ingredientes. Esta parte del proyecto está actualmente en desarrollo, ya que obtener todos estos datos requiere de tiempo.

Los métodos matemáticos aplicados al cálculo de combinaciones sinérgicas implican la necesidad de obtener datos en combinación. El método actualmente aplicado es el cálculo del índice de combinación o CI, el cual requiere de los datos de actividad de cada ingrediente y su combinación, para cada modelo experimental. Este cálculo solo se ha aplicado a las combinaciones que incluían los datos de cada ingrediente. El principal problema de estos métodos es la falta de información que permita obtener unos valores de sinergia aplicables a nuestra ecuación matemática de ponderación.

Por otro lado, los métodos de predicción basados en herramientas como redes neuronales o árbol de decisiones, requiere de un volumen de datos iniciales y valores finales permitiendo al sistema entrenar la respuesta. En función de este entrenamiento los datos obtenidos ante nuevos datos iniciales serán más o menos fiables. Este tipo de algoritmos requieren de una alta cantidad de datos iniciales, lo que implica que el número de 600 ingredientes no sea suficiente. El sistema está diseñado para incluir estos métodos una vez se tengan la cantidad suficiente de valores. Para ello se ha incluido la composición química de los ingredientes, incluyendo los datos estructurales. Estos descriptores moleculares permiten describir una estructura que especifica su composición química con atributos que la definan. Esta información será el input para un algoritmo de predicción de actividades de combinaciones de ingredientes.

DISCUSIÓN

La piel es uno de los órganos más grandes del cuerpo humano y forma la barrera de protección externa que impide la entrada de agentes y elimina tóxicos. La piel no solo refleja el estado de salud del individuo, sino que también está afectada por un amplio número de patologías. La piel sufre cambios visibles debidos a agentes externos como la exposición a UV, a tóxicos, agentes infecciosos y a la polución ambiental, y también a agentes internos debidos a una mala alimentación. Todos estos agentes favorecen la aparición de signos relacionados con el envejecimiento de la piel (Gravitz 2018; Khavkin and Ellis 2011; McDaniel, Farris, and Valacchi 2018), y por tanto el cuidado de la piel es el principal objetivo de la cosmética.

Los ingredientes en la piel se denominan por una nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI), determinando una nomenclatura común para todos los productos a nivel mundial. Esta nomenclatura es aplicada en las etiquetas de los productos, donde debe aparecer una lista con los ingredientes de una concentración de mayor a menor cantidad (Giordano-Labadie 2012). Por otro lado, se han desarrollado informes para cada ingrediente (*Cosmetic Ingredient Review*, CIR) donde se especifica como actúa, que toxicidad tiene y como debe aplicarse (https://www.cir-safety.org; Boyer, Bergfeld, Heldreth, Fiume, & Gill, 2017). Actualmente, la descripción de la actividad de cada ingrediente es fundamental, ya que se puede observar que un mismo ingrediente con igual INCI y diferente proveedor presenta actividades diferentes. Por ejemplo, los proveedores A y B comercializan un extracto de plantas con el mismo código INCI, sin embargo, el origen de la planta, su manera de cultivarse, el método de extracción y producción hacen que la fitoquímica del extracto sea completamente diferente y por también sus actividades biológicas no sean las mismas (Evstatieva et al. 2010). Aunque se han desarrollado varias herramientas tanto *in silico* como *in vitro* para mejorar el conocimiento de estos productos aún hay muchos inconvenientes que resolver.

La naturaleza de los ingredientes permite conocer su grado de acción, diferenciando compuestos obtenidos químicamente o mediante una extracción de una planta u otro elemento. El conocimiento de la extracción de los principios activos también ayuda a entender los activos presentes en nuestros ingredientes, la técnica aplicada para su extracción determinará si el producto contiene los activos liposolubles o hidrosolubles del compuesto inicial (Cools and Terry 2012; Sepahpour et al. 2018). Los activos liposolubles se quedarán en las capas más externas de la piel favoreciendo la protección de la piel, donde

presentan una mayor cantidad de contenido lipídico, y los hidrosolubles penetran en capas más profundas mejorando las condiciones internas (Wohlrab, Gebert, and Neubert 2018). Los ingredientes pueden actuar en diferentes dianas, por lo que, el conocimiento de su mecanismo de acción es otro punto clave, ya que permite conocer el nivel de actuación y la relación dosis respuesta correcta para su aplicación. Al conocer estos datos se puede determinar la concentración óptima de cada ingrediente en un producto final.

El presente trabajo consiste en desarrollar herramientas informáticas que ayudan tanto en la compilación de toda la información de cada ingrediente, incluyendo la información pública como en la información proporcionada por la plataforma interna de modelos experimentales SimDerma. Esta base nos permite asimismo desarrollar otras herramientas para el estudio de combinaciones de ingredientes sinérgicas aplicadas a diferentes indicaciones.

Esta herramienta consiste en tres partes, primero diseñar y desarrollar una base de datos para recopilar toda la información de cada ingrediente presente, segundo completar la información mediante los experimentos *in vitro* realizados en la plataforma interna SimDerma, y tercero generar una herramienta donde proponemos combinación de ingredientes para un uso óptimo, en cada aplicación implicada.

La primera premisa se desarrolló con el conocimiento de herramientas informáticas donde almacenar toda la información y estructurarla correctamente, como son las bases de datos. Actualmente, todo conocimiento es susceptible de ser almacenado y guardado, el principal problema de los últimos años es como se almacena esa información y en qué medida se aplica. En investigación esta herramienta comienza a ser clave para su avance, ya que se genera mucha información que resulta muy difícil de unificar y comprender en la medida en que es obtenida. Por ello, este tipo de herramientas empiezan a ser fundamentales y la interrelación de datos ayuda a generar un espacio multidisciplinar donde ciertos datos que parecen opuestos presentan una conexión indirecta muy clara, lo que nos puede ayudar en desarrollar mejores productos cosméticos.

Existen multitud de bases de datos y en esta Tesis se han aplicado bases de datos relacionales, donde los datos se estructuran de manera muy definida favoreciendo las relaciones entre ellos. Para ello, se ha realizado una agrupación de los datos en tablas y

unificado en los siguientes grupos: ingredientes, normativa o regulación, vendedores, certificados, clasificación de ingredientes, composición química, modelos experimentales, referencias bibliográficas e indicaciones dermocosméticas. Una vez establecidas las tablas se definieron los atributos o contenido de cada tabla y la relación entre ellas. Esta estructura se diseñó para abarcar multitud de diferentes bases de datos e información para cada ingrediente. Por otro lado, este tipo de herramientas también nos permite realizar un seguimiento de la información de cada ingrediente, ayudando a comprender mejor desde diferentes puntos, el conocimiento y un completo análisis.

Nuestra herramienta permitirá unificar la información de bases de datos pública con información interna generada en experimentos de laboratorio propios. Esta información interna obtenida debido a SimDerma ayuda a obtener un conocimiento ampliado y detallado del grado de actuación de los ingredientes en las diferentes dianas moleculares de interés en cosmética y la relación dosis-respuesta permite tener un gráfico de actividad de cada ingrediente en cada modelo experimental.

Las bases de datos con información pública específica son las siguientes. La información química ha sido obtenida de PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), base de datos conocida por almacenar toda la información química de compuestos, la cual se complementa con información estructural de la molécula, como son los diferentes nombres comunes y alternativos, estructuras químicas, además de sus propiedades, que nos ayudan a comprender mejor la estructura-función. Por otro lado, esta herramienta se conecta con PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov), información bibliográfica, donde se determina tanto las publicaciones relativas a los ingredientes como a los compuestos químicos, modelos experimentales e indicaciones. Finalmente, la normativa europea de los ingredientes ha desarrollado una base de datos pública CosIng (https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosing_en), donde se especifica la nomenclatura de cada ingrediente, dosis, función y composición. Estas bases de datos ayudan a determinar la información pública existente de cada ingrediente.

Actualmente, existen bases de datos con información aplicada a uso cosmético, que presentan características en común. Un de ellas es Coptis (https://www.coptis.com), un conjunto de herramientas donde la primera de ellas se denomina ingredients, una base de datos que contiene toda la información de cada ingrediente, la segunda se denomina lab e

incluye la información generada de las pruebas de combinaciones teóricas de ingredientes para incluir en un producto final, y la tercera se denomina tox, la cual introduce toda la información pública de toxicidad de los ingredientes. La herramienta Coptis se ha desarrollado para producir nuevas combinaciones en un producto final, pero como se ha comentado anteriormente no hay diferencia entre las actividades distintas biológicas que pueden tener los ingredientes de varios proveedores y que tienen el mismo código INCI.

Sin embargo, nuestra herramienta se focaliza en un paso anterior crítico como es el conocimiento de datos reales de cada ingrediente funcional a introducir en un producto final. Así, también incluimos la información pública, punto en común, pero además introducimos toda la información desarrollada *in vitro* mediante el uso de SimDerma, que implica dos puntos bien definidos, que son la información de cada ingrediente dado por el proveedor y su grado de actividad en cada modelo experimental concreto obtenido internamente en SimDerma.

La empresa lhasa limited (https://www.lhasalimited.org) dispone de un conjunto de herramientas de predicción *in silico* aplicadas a determinar toxicidad, metabolismo, mutagenicidad, entre otras. Esta herramienta permite enfocarse en una predicción de la actividad de compuestos químicos en diferentes campos, siendo una herramienta focalizada al conocimiento de los ingredientes, pero desde un punto de vista *in silico*. No obstante, sus plataformas están más orientadas al desarrollo de fármacos y quizás a compuestos puros de uso cosmético, mientras que INCOS tiene tanto compuestos puros como extractos vegetales. Además, INCOS solo trabaja con ingredientes cosméticos aprobados para su comercialización y por tanto no es una herramienta de predicción de toxicidad.

El conocimiento de los ingredientes es fundamental, pero los ingredientes no suelen usarse solos, siempre están sobre una base o en combinación de dos o más ingredientes. Por ello, el conocimiento de la combinación de ingredientes utilizando INCOS es otro objetivo presentado en esta Tesis. La combinación de ingredientes permite optimizar la relación dosis efecto, ya que dos ingredientes pueden tener una reacción entre ambos. Durante la combinación de ingredientes se puede obtener tres reacciones entre ellos: sinergia, actividad aditiva y antagonismo. La actividad aditiva entre dos o más ingredientes es la suma de cada uno de ellos por separado. La sinergia es una reacción positiva, ya que la actividad final es mayor que la suma de cada uno sus actividades individuales, por lo tanto,

la regulación de la dosis es un paso fundamental, ya que, al obtener una mayor actividad, la dosis debe ser menor. El caso contrario es el antagonismo, con una menor actividad que ambos ingredientes por separado, indicando que esos ingredientes no pueden estar juntos, ya que uno inhibe parcialmente la acción del otro. Estos casos son el punto clave en el desarrollo de la combinación, mejorando un producto al combinar dos o más ingredientes que den lugar a una respuesta más alta y por lo tanto más efectiva.

Las combinaciones en nuestro caso implican la combinación del conocimiento de los ingredientes de manera individual, ya que actualmente no se dispone de datos suficientes sobre combinación de ingredientes. Por ello, se centraliza la búsqueda en el conocimiento de las rutas implicadas en una indicación seleccionada previamente, donde se establecen una serie de restricciones si la persona implicada en la búsqueda así lo requiere. Por otro lado, se seleccionan los ingredientes que impliquen actividad en las rutas en esa indicación y se eliminan los ingredientes activos en las rutas que conocen su antagonismo con respecto a la indicación. Este es un primer paso para determinar una combinación de ingredientes, donde se observa la combinación en la plataforma de modelos experimentales, además de obtener los datos en combinación, y así establecen patrones entre los ingredientes.

En INCOS, se ha incorporado una tabla para completar la información en combinación, por lo tanto, para poder aplicar todos los modelos anteriormente descritos. Por ello, actualmente solo se pueden aplicar unas reglas de árbol de decisiones, donde ir aplicando restricciones para finalmente proponer combinaciones que se midan en el laboratorio y ayuden a contribuir a obtener en un futuro reglas de predicción de combinación de ingredientes.

El principal problema de la combinación de ingredientes es el número de ingredientes que se combinan, y segundo se puede presentar una reacción entre los ingredientes o reaccionas adversas no esperadas. Las posibilidades de combinaciones son infinitas, ya que a mayor número de ingredientes mayor probabilidad de reacción. Según otros trabajos se puede observar como las herramientas informáticas de predicción de acción de ingredientes, proponen dos modelos. Un modelo matemático donde se estipula mediante ponderación, como de activo es una combinación, y otro modelo donde predicen la actividad. Estos modelos proponen una valoración de cada ingrediente y una combinación que se ensaya y se incluye en la ponderación para INCOS. En este método se permite la introducción de nuevos datos y, por lo tanto, de una actividad constante del programa y mejora de la

propuesta. Este modelo nos permite aumentar y mejorar la información con buenas propuestas renovadas de diferentes combinaciones de ingredientes.

Conclusiones

Se ha desarrollado un sistema LIMS para integrar las actividades biológicas alcanzadas en los ensayos in vitro utilizando SimDerma, una base de datos adaptada al funcionamiento de INCOS.

1. Se ha utilizado LIMS para normalizar las actividades biológicas que se integran a partir de ensayos realizados *in vitro* y elaborados utilizando diferentes protocolos para el mismo modelo experimental.

2. Se ha mostrado que LIMS evalúa en tiempo real la agregación estadística de múltiples actividades biológicas obtenidas en diferentes ensayos in vitro para un mismo ingrediente.

3. INCOS es una herramienta informática basada en datos públicos y en datos reales internos generados en la empresa InnoHealth Group.

4. INCOS puede predecir combinaciones de ingredientes cosméticos con actividades sinérgicas o aditivas para diferentes aplicaciones dermocosméticas.

5. INCOS puede utilizar filtros basados en metadatos, adicionales a la actividad biológica obtenida en los ensayos para la predicción de combinaciones, tales como la existencia de certificados obtenidos por los ingredientes sometidos a ensayos.

Referencias Bibliográficas

Abdayem, R., and M. Haftek. 2018. "The Epidermal Barrier." *Annales de Dermatologie et de Venereologie* 145(4): 293–301. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0151963817310438 (March 24, 2020).

Al-Bader T1, Byrne A, Gillbro J, Mitarotonda A, Metois A, Vial F, Rawlings AV, Laloeuf A. 2012. "Effect of Cosmetic Ingredients as Anticellulite Agents: Synergistic Action of Actives with in Vitro and in Vivo Efficacy." *Journal of Cosmetic Dermatology* 11(1): 17–26.

Ali, S, and G Yosipovitch. 2013. "Skin PH: From Basic SciencE to Basic Skin Care." *Acta Dermato Venereologica* 93(3): 261–67. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23322028 (September 25, 2019).

Alonso, Laura, and Elaine Fuchs. 2003. "Stem Cells of the Skin Epithelium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(SUPPL. 1): 11830–35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12913119 (September 25, 2019).

Arda, Oktay, Nadir Göksügür, and Yalçin Tüzün. 2014. "Basic Histological Structure and Functions of Facial Skin." *Clinics in Dermatology* 32(1): 3–13.

Baroni, Adone et al. 2012. "Structure and Function of the Epidermis Related to Barrier Properties." *Clinics in Dermatology* 30(3): 257–62. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0738081X11002112 (June 16, 2020).

Blanco-Dávila, Feliciano. 2000. "Beauty and the Body: The Origins of Cosmetics." *Plastic & Reconstructive Surgery* 105(3): 1196–1204. https://insights.ovid.com/crossref?an=00006534-200003000-00058 (September 23, 2019).

BLISS, C. I. 1939. "The Toxicity of Poisons Applied Jointly." *Annals of Applied Biology* 26(3): 585–615.

Boyer, Ivan J. et al. 2017. "The Cosmetic Ingredient Review Program—Expert Safety Assessments of Cosmetic Ingredients in an Open Forum." *International Journal of Toxicology* 36(5_suppl2): 5S-13S. http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1091581817717646 (September 11, 2019).

Bylka, Wiesława et al. 2014. "Centella Asiatica in Dermatology: An Overview."

Phytotherapy Research 28(8): 1117–24.

Cañada, Andres et al. 2017. "LimTox: A Web Tool for Applied Text Mining of Adverse Event and Toxicity Associations of Compounds, Drugs and Genes." *Nucleic acids research* 45(W1): W484–89. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28531339 (June 19, 2018).

Chaudhri, S K, and N K Jain. 2009. "History of Cosmetics." *Asian Journal of Pharmaceutics*: 164–67. https://pdfs.semanticscholar.org/6c76/09a33cd016d4038600c4d7560b13bf923c8c.pdf (September 3, 2019).

Chen, Yalan, Yuxin Lin, Xuye Yuan, and Bairong Shen. 2016. "LIMS and Clinical Data Management." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer New York LLC, 225–39. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27807749 (April 29, 2020).

Chou, T.-C. 2010. "Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method." *Cancer Research* 70(2): 440–46. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20068163 (September 26, 2019).

Chou, Ting-Chao. 2006. "Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies." *Pharmacological Reviews* 58(3): 621–81. http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.58.3.10 (September 26, 2019).

Cools, Katherine, and Leon A. Terry. 2012. "Comparative Study between Extraction Techniques and Column Separation for the Quantification of Sinigrin and Total Isothiocyanates in Mustard Seed." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 901: 115–18.

Eckhart, Leopold, Saskia Lippens, Erwin Tschachler, and Wim Declercq. 2013. "Cell Death by Cornification." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*.

Eixarch, Helena, Louis Wyness, and Musa Sibanda. 2019. "The Regulation of Personalized Cosmetics in the EU." *Cosmetics* 6(2).

Evstatieva, Ljuba, Milka Todorova, Daniela Antonova, and Jordanka Staneva. 2010.

"Chemical Composition of the Essential Oils of Rhodiola Rosea L. of Three Different Origins." *Pharmacognosy Magazine* 6(24): 256–58.

Fengyang, Li et al. 2012. "Stevioside Suppressed Inflammatory Cytokine Secretion by Downregulation of NF-KB and MAPK Signaling Pathways in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells." *Inflammation* 35(5): 1669–75. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22644339 (November 22, 2018).

Flobak, Åsmund, Miguel Vazquez, Astrid Lægreid, and Alfonso Valencia. 2017. "CImbinator: A Web-Based Tool for Drug Synergy Analysis in Small- and Large-Scale Datasets." *Bioinformatics (Oxford, England)* 33(15): 2410–12. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28444126 (June 19, 2018).

Foucquier, Julie, and Mickael Guedj. 2015. "Analysis of Drug Combinations: Current Methodological Landscape." *Pharmacology research & perspectives* 3(3): e00149. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26171228 (June 19, 2018).

García, C. et al. 2018. "Benefits of VCE-003.2, a Cannabigerol Quinone Derivative, against Inflammation-Driven Neuronal Deterioration in Experimental Parkinson's Disease: Possible Involvement of Different Binding Sites at the PPARγ Receptor." *Journal of Neuroinflammation* 15(1).

Giordano-Labadie, Françoise. 2012. "Cosmetic Products: Learning to Read Labels." *European Journal of Dermatology* 22(5): 591–95.

Goldoni, Matteo, and Carolina Johansson. 2007. "A Mathematical Approach to Study Combined Effects of Toxicants in Vitro: Evaluation of the Bliss Independence Criterion and the Loewe Additivity Model." *Toxicology in Vitro* 21(5): 759–69. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233307000677 (September 26, 2019).

Gonzales, Kevin Andrew Uy, and Elaine Fuchs. 2017. "Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche." *Developmental Cell* 43(4): 387–401.

Gravitz, Lauren. 2018. "Skin." *Nature* 563(7732): S83. http://www.nature.com/articles/d41586-018-07428-4 (March 23, 2020).

Grice, Elizabeth A, and Julia A Segre. 2011. "The Skin Microbiome." *Nature reviews.*

Microbiology 9(4): 244–53. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21407241 (September 25, 2019).

Gupta, Deepika, Bruce Bleakley, and Rajinder K Gupta. 2008. "Dragon's Blood: Botany, Chemistry and Therapeutic Uses." *Journal of Ethnopharmacology* 115: 361–80. www.sciencedirect.com (October 29, 2018).

Hannezo, Edouard, Jacques Prost, and Jean-Francois Joanny. 2014. "Theory of Epithelial Sheet Morphology in Three Dimensions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(1): 27–32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24367079 (September 25, 2019).

Heisenberg, Carl-Philipp, and Yohanns Bellaïche. 2013. "Forces in Tissue Morphogenesis and Patterning." *Cell* 153(5): 948–62. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706734 (September 25, 2019).

Herman, A, and A P Herman. 2013. "Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use." *Skin Pharmacol.Physiol* 26(1660-5535 (Electronic)): 8–14.

Herman, Anna, and Andrzej P. Herman. 2015. "Essential Oils and Their Constituents as Skin Penetration Enhancer for Transdermal Drug Delivery: A Review." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 67(4): 473–85.

Hernando, Isabel, Ramón Denia Lafuente, Mª Luisa Arcilla, and Pilar Recio Rivas. 2004. *Introducción a La Cosmética Y Dermofarmacia*. https://www2.uned.es/experto-cosmetica-dermofarmacia/parcial_modulo1.pdf (September 5, 2019).

Hill, A. V. 1910. "The Possible Effects of the Aggregation of the Molecules of Hemoglobin on Its Dissociation Curves." *The Journal of Physiology*. http://mathgeomsrv2.epfl.ch/teaching/oldCourses/2017-2018/MathematicalPhysiology/protected_files/articles/Hill.pdf (September 30, 2019).

Ben Hsouna, Anis, Nihed Ben Halima, Slim Smaoui, and Naceur Hamdi. 2017. "Citrus Lemon Essential Oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities with Its Preservative Effect against Listeria Monocytogenes Inoculated in Minced Beef Meat." *Lipids in Health and Disease* 16(1): 1–11.

Jia, Yan et al. 2018. "The Mechanism of Skin Lipids Influencing Skin Status." *Journal of*

Dermatological Science 89(2): 112–19. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29174114 (September 25, 2019).

Johnson, Jodi L., Nicole A. Najor, and Kathleen J. Green. 2014. "Desmosomes: Regulators of Cellular Signaling and Adhesion in Epidermal Health and Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4(11).

Kashyap, Dharambir et al. 2016. "Ursolic Acid and Oleanolic Acid: Pentacyclic Terpenoids with Promising Anti-Inflammatory Activities." *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery* 10(1): 21–33. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27531153 (October 23, 2018).

Khavkin, Jeannie, and David A.F. Ellis. 2011. "Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology." *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* 19(2): 229–34. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1064740611000046 (September 12, 2019).

Kim, Tae Kon, and Kyoung Sik Park. 2015. "Inhibitory Effects of Harpagoside on TNF-α-Induced pro-Inflammatory Adipokine Expression through PPAR-γ Activation in 3T3-L1 Adipocytes." *Cytokine* 76(2): 368–74. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26049170 (December 3, 2018).

Koster, Maranke I, and Dennis R Roop. 2007. "Mechanisms Regulating Epithelial Stratification." http://cellbio.annualreviews.org (March 23, 2020).

de Lapuente, J et al. 2014. "Los Métodos Alternativos En El Estudio de La Seguridad de Cosméticos." *Rev. Toxicol.* 31: 140–48. http://diposit.ub.edu/dspace/bitstream/2445/65169/1/645822.pdf (September 18, 2019).

Li, Hongzhong et al. 2009. "Madecassoside Attenuates Inflammatory Response on Collagen-Induced Arthritis in DBA/1 Mice." *Phytomedicine* 16(6–7): 538–46. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19135346 (November 21, 2018).

Lim, S W et al. 2007. "Simultaneous Effect of Ursolic Acid and Oleanolic Acid on Epidermal Permeability Barrier Function and Epidermal Keratinocyte Differentiation via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Alpha." *J.Dermatol.* 34(0385-2407 (Print)): 625–34.

LOEWE, S. 1953. “The Problem of Synergism and Antagonism of Combined Drugs.” *Arzneimittel-Forschung* 3(6): 285–90. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13081480 (September 26, 2019).

Losquadro, William D. 2017. “Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer.” *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* 25(3): 283–89. https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1064740617300263 (September 13, 2019).

Maier, Holger et al. 2015. “Principles and Application of LIMS in Mouse Clinics.” *Mammalian Genome* 26(9–10): 467–81. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26208973 (April 29, 2020).

McDaniel, David, Patricia Farris, and Giuseppe Valacchi. 2018. “Atmospheric Skin Aging—Contributors and Inhibitors.” *Journal of Cosmetic Dermatology* 17(2): 124–37.

Netzlaff, Frank, C. M. Lehr, P. W. Wertz, and U. F. Schaefer. 2005. “The Human Epidermis Models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An Evaluation of Morphology and Their Suitability for Testing Phototoxicity, Irritancy, Corrosivity, and Substance Transport.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 60(2): 167–78.

Park, Sun Young et al. 2012. “Anti-Inflammatory Effects of Aromatic-Turmerone through Blocking of NF-KB, JNK, and P38 MAPK Signaling Pathways in Amyloid β-Stimulated Microglia.” *International Immunopharmacology* 14(1): 13–20. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22728094 (December 19, 2018).

Price, Andrew J et al. 2018. “Mechanical Loading of Desmosomes Depends on the Magnitude and Orientation of External Stress.” *Nature Communications* 9(1): 1–11. www.nature.com/naturecommunications (April 15, 2020).

Proksch, Ehrhardt. 2018. “PH in Nature, Humans and Skin.” *Journal of Dermatology* 45(9): 1044–52.

Rinnerthaler, Mark, and Klaus Richter. 2018. “The Influence of Calcium on the Skin PH and Epidermal Barrier During Aging.” *Current Problems in Dermatology (Switzerland)* 54: 79–86.

del Rio, Carmen et al. 2018. “VCE-004.3, a Cannabidiol Aminoquinone Derivative, Prevents Bleomycin-Induced Skin Fibrosis and Inflammation through PPARγ- and CB2 Receptor-Dependent Pathways.” *British Journal of Pharmacology* 175(19): 3813–31.

Rippa, Alexandra L., Ekaterina P. Kalabusheva, and Ekaterina A. Vorotelyak. 2019. “Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved.” *Cells* 8(6): 607.

Roell, Kyle R., David M. Reif, and Alison A. Motsinger-Reif. 2017. “An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy-Perspectives from across Disciplines.” *Frontiers in Pharmacology* 8(APR): 1–11.

Schopohl, P., P. Grüneberg, and M.F. Melzig. 2016. “The Influence of Harpagoside and Harpagide on TNFα-Secretion and Cell Adhesion Molecule MRNA-Expression in IFNγ/LPS-Stimulated THP-1 Cells.” *Fitoterapia* 110: 157–65. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26979254 (December 17, 2018).

Sepahpour, Shabnam et al. 2018. “Comparative Analysis of Chemical Composition, Antioxidant Activity and Quantitative Characterization of Some Phenolic Compounds in Selected Herbs and Spices in Different Solvent Extraction Systems.” *Molecules* 23(2).

da Silva Prade, Josiéle et al. 2020. “Anti-Inflammatory Effect of Arnica Montana in a UVB Radiation-Induced Skin-Burn Model in Mice.” *Cutaneous and Ocular Toxicology*.

Solanas, Guiomar, and Salvador Aznar Benitah. 2013. “Regenerating the Skin: A Task for the Heterogeneous Stem Cell Pool and Surrounding Niche.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14(11): 737–48. http://www.nature.com/articles/nrm3675 (September 26, 2019).

Song, Daqiang et al. 2018. “Asiaticoside Attenuates Cell Growth Inhibition and Apoptosis Induced by Aβ1-42 via Inhibiting the TLR4/NF-KB Signaling Pathway in Human Brain Microvascular Endothelial Cells.” *Frontiers in Pharmacology* 9: 28. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29441018 (November 21, 2018).

Tang, Sheau-Chung, and Jen-Hung Yang. 2018. “Molecules Dual Effects of Alpha-Hydroxy Acids on the Skin.” www.mdpi.com/journal/molecules (April 19, 2020).

Tigges, Julia et al. 2014. “The Hallmarks of Fibroblast Ageing.” *Mechanisms of Ageing and Development* 138(1): 26–44.

Wohlrab, Johannes, Alexandra Gebert, and Reinhard H.H. Neubert. 2018. “Lipids in the Skin and PH.” *Current Problems in Dermatology (Switzerland)* 54: 64–70. https://www.karger.com/Article/FullText/489519 (March 23, 2020).